



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**



**MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

**Identificação de micobactérias não tuberculosas  
através de métodos moleculares não comerciais**

**Pedro Alexandre Rodrigues Cerca**

**2010**



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**



# **Identificação de micobactérias não tuberculosas através de métodos moleculares não comerciais**

**Pedro Alexandre Rodrigues Cerca**

Tese apresentada para a obtenção do grau de  
Mestre em Ciências Biomédicas,  
especialidade de Biologia Molecular em  
Medicina Tropical e Internacional.

**Orientador**

**Professora Doutora Isabel Couto**

**Os resultados apresentados foram objecto de apresentação em co-autoria da seguinte comunicação em congresso sob a forma de Poster:**

**Cerca, P., D. Machado, M. Viveiros, L. Amaral, and I. Couto.** Identification of nontuberculous mycobacteria by molecular methods: comparison of three in-house protocols. Aceite para apresentação no Congresso Nacional de Microbiologia MicroBiotec09. Vilamoura. Novembro 2009

## **Agradecimentos**

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho, que me encorajaram durante o meu percurso científico e me proporcionaram a oportunidade de trabalhar nos seus laboratórios. De entre os que contribuíram para a realização deste trabalho gostaria de salientar:

A Professora Doutora Isabel Couto, minha orientadora de mestrado, com quem muito aprendi ao longo deste tempo e com quem espero, de futuro, aprender muito mais. Quero agradecer, especialmente, a sua constante disponibilidade, ajuda e empenho em transmitir os conhecimentos que contribuíram não só para a realização deste trabalho, mas também para o meu crescimento profissional.

O Professor Doutor Miguel Viveiros e o Professor Doutor Leonard Amaral pelos conhecimentos transmitidos e por me terem proporcionado a oportunidade de trabalhar no laboratório de Micobactérias no Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

A todos os elementos da unidade de Micobactérias, especialmente à Diana Machado, pelos conhecimentos que me transmitiu e pela sua constante disponibilidade.

A todos os meus colegas de mestrado pelo companheirismo demonstrado.

A todas as pessoas que contribuíram, diariamente, para o funcionamento do laboratório.

A toda a minha família, em especialmente aos meus pais e a todos o meu amigos pelo seu apoio incondicional.

## Índice Geral

Agradecimentos .....	i
Índice Geral .....	ii
Índice de Tabelas .....	vii
Lista de Abreviaturas .....	viii
Resumo .....	x
Abstract .....	xii
I – INTRODUÇÃO .....	1
1. O género <i>Mycobacterium</i> .....	1
2. Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e as micobactérias não tuberculosas .....	3
2.1 Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	3
2.2 Micobactérias não tuberculosas .....	4
2.2.1 Ecologia das micobactérias não tuberculosas .....	6
2.2.2 Sistemas de classificação das micobactérias não tuberculosas .....	10
2.2.2.1 Classificação de Runyon .....	10
2.2.2.2 Classificação baseada em grupos de risco .....	11
2.2.3 Complexos de espécies de micobactérias não tuberculosas .....	12
2.2.4 Patogenia .....	15
2.2.5 Aumento da incidência das infeções por micobactérias não tuberculosas .....	17

2.2.6 Contribuição da SIDA no aumento das infecções provocadas por micobactérias não tuberculosas .....	18
2.2.7 Significado clínico da detecção de micobactérias em amostras clínicas.....	19
3. Identificação de micobactérias não tuberculosas .....	21
3.1 Métodos de identificação convencionais .....	21
3.1.1 Temperatura óptima de crescimento .....	23
3.1.2 Características bioquímicas das micobactérias não tuberculosas com maior importância clínica .....	24
3.2 Métodos de identificação com base na análise de ácidos micólicos .....	26
3.3 Métodos de identificação moleculares.....	26
3.3.1 Técnicas baseadas em PCR-RFLP .....	27
3.3.1.2 Gene do 16S rRNA .....	28
3.3.1.1 Gene <i>hsp65</i> .....	28
3.3.1.3 Região ITS.....	29
3.3.2 Hibridação de ácidos nucleicos.....	30
3.3.2.1 Sistema Accuprobe .....	30
3.3.2.2 Sistemas de hibridação reversa.....	32
3.3.2.2.1 Inno LiPA Mycobacteria v2.....	32
3.3.2.2.2 GenoType® Mycobacterium .....	33
3.3.3 Sequenciação de DNA.....	33
3.3.4 Microarrays .....	36
II. Objectivos .....	38

III - MATERIAL E MÉTODOS.....	39
1. Materiais .....	39
1.1 Material biológico.....	39
1.1.1 Estirpes de referência .....	39
1.1.2 Estirpes clínicas.....	39
1.1.3 Outro material biológico.....	41
1.1.3.1 Marcadores de peso molecular .....	41
1.1.3.2 “Primers” .....	41
1.2 Soluções, géis e enzimas .....	42
2. Métodos .....	44
2.1 Extracção de DNA genómico .....	44
2.2 Reacção em cadeia da Polimerase .....	45
2.3 Purificação dos produtos amplificados .....	46
2.4 Digestão enzimática .....	47
2.5 Condições específicas do método de identificação baseado na região ITS .....	48
2.5.1 Condições de PCR.....	48
2.5.2 Condições de restrição.....	48
2.6 Condições específicas do método de identificação baseado no ITS e regiões adjacentes .....	49
2.6.1 Condições de PCR.....	49
2.6.2 Condições de restrição.....	50
2.7 Condições específicas do método de identificação baseado no gene <i>hsp65</i> .....	50
2.7.1 Condições de PCR.....	50

2.7.2 Condições de restrição.....	51
IV – RESULTADOS .....	52
1. PCR RFLP da região ITS.....	52
2. PCR RFLP da região ITS e regiões adjacentes .....	61
3. Gene <i>hsp65</i> .....	65
V – DISCUSSÃO .....	72
1. Capacidade de identificação de MNT .....	73
2. Capacidade de diferenciação de MNT .....	76
2.1 PCR-RFLP de ITS .....	76
2.2 Região ITS e regiões adjacentes.....	80
2.3 Gene <i>hsp65</i> .....	82
3. Capacidade de diferenciação entre MNT e <i>M. tuberculosis</i> .....	85
4. Problemas inerentes à análise dos resultados .....	85
V. CONCLUSÕES .....	88
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	91



## Índice de Figuras

Figura 1. Classificação de micobactérias não tuberculosas segundo o sistema de Runyon.....	11
Figura 2. Electroforese em gel de agarose (3%) dos produtos de amplificação da região ITS.....	52
Figura 3. Electroforese em gel de agarose Metaphor® (3,5%) dos produtos resultantes da restrição dos produtos de amplificação da região ITS com a enzima de restrição <i>HaeIII</i> .....	53
Figura 4. Electroforese em gel de agarose Metaphor® (3,5%) dos produtos resultantes da restrição dos produtos de amplificação da região ITS com a enzima de restrição <i>CfoI</i> .....	54
Figura 5. Electroforese em gel de agarose Metaphor® (3,5%) dos produtos resultantes da restrição dos produtos de amplificação da região ITS com a enzima de restrição <i>TaqI</i> .....	54
Figura 6. Electroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de amplificação da região ITS e regiões adjacentes. ....	61
Figura 7. Electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos resultantes da restrição dos produtos amplificação da região ITS e regiões adjacentes com a enzima de restrição <i>HhaI</i> .....	62
Figura 8. Electroforese em gel de agarose (3%) dos produtos resultante da amplificação do gene <i>hsp65</i> .....	65
Figura 9. Electroforese em gel de agarose Metaphor® (3,5%) dos produtos resultante da restrição dos produtos de amplificação do gene <i>hsp65</i> com a enzima de restrição <i>BstEII</i> .....	66
Figura 10. Electroforese em gel de agarose Metaphor® (3,5%) dos produtos resultante da restrição dos produtos de amplificação do gene <i>hsp65</i> com a enzima de restrição <i>HaeIII</i> . ....	66
Figura 11. Árvore filogenética com base na análise do gene do 16S rRNA de micobactérias de crescimento rápido.....	80

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Classificação das espécies micobactérias de acordo com o risco de infecção para o Homem.....	12
Tabela 2. Patogenias mais comuns provocadas por micobactérias não tuberculosas.....	16
Tabela 3. Critérios de diagnósticos de micobactérias não tuberculosas para doenças pulmonares ..	20
Tabela 4. Testes bioquímicos mais utilizados para a identificação de micobactérias não tuberculosas com maior importância clínica. ....	25
Tabela 5. Estirpes de referências utilizadas.....	39
Tabela 6. Isolados clínicos estudados. ....	40
Tabela 7. Sequências dos “primers” utilizados neste trabalho. ....	42
Tabela 8. Composição das soluções tampão utilizadas.....	43
Tabela 9. Composição das soluções utilizadas para electroforese.....	43
Tabela 10. Características das enzimas de restrição utilizadas. ....	44
Tabela 11. Identificação de micobactérias por PCR- RFLP de ITS, através da análise dos fragmentos obtidos após amplificação e restrição dos produtos amplificados com diferentes enzimas. ....	55
Tabela 12. Identificação de micobactérias por PCR-RFLP 16S-ITS-23S através da análise dos fragmentos obtidos após amplificação e restrição dos produtos amplificados com a enzima <i>HhaI</i> . ....	63
Tabela 13. Identificação de micobactérias por PCR-RFLP de <i>hsp65</i> , através da análise dos fragmentos obtidos após amplificação e restrição dos produtos amplificados com <i>BstEII</i> e <i>HaeIII</i> . ....	67
Tabela 14. Comparação entre os resultados obtidos com os métodos de identificação testados neste estudo.....	75

## Lista de Abreviaturas

A - adenina

AS - espécies adicionais, de “additional species”

ATCC - “American Type Culture Collection” (Virginia, EUA)

BAAR - bacilos álcool-ácido resistentes

BCG - bacille Calmette-Guérin

C - citosina

CM - micobactérias comuns, de “common mycobacteria”

CMI - Concentração mínima inibitória

DNA - ácido desoxirribonucleico, de “deoxyribonucleic acid”

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EtBr - brometo de etídeo, de “ethidium bromide”

EUA - Estados Unidos da América

G - guanina

GLC - cromatografia gás-liquido, de “gas-liquid chromatography”

HPLC - cromatografia líquida *de* alta resolução, de “high performance liquid chromatography”

*hsp* - proteína de choque térmico, de “heat shock protein”

ITS - região espaçadora intragénica, de “Internal Transcribed Spacer”

kb - kilobases

kDa - kilodalton

MAC - complexo *M. avium*, de “*M. avium* complex”

MGIT - de “mycobacteria growth indicator tube”

MNT – micobactérias não tuberculosas

MOTT - outras micobactérias que não *Mycobacterium tuberculosis*, de “mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*”

nt – nucleótido

OMS - Organização Mundial de Saúde

pb - pares de bases

PCR- reacção de polimerase em cadeia, de “polymerase chain reaction”

PRA - “polymerase chain reaction restriction enzyme analysis”

rDNA - DNA ribosomal, de “ribosomal DNA”

RFLP - análise de polimorfismos de restrição, de “restriction fragment length polymorfism”

RNA - ácido ribonucleico, de “ribonucleic acid”

rpm- rotações por minuto

rRNA - RNA ribosomal, *de “ribosomal RNA”*

SIDA - síndrome de imunodeficiência adquirida

T - timina

TLC - cromatografia de camada fina, de “thin-layer chromatography”

V- Volt

VIH - vírus da imunodeficiência humana

## Resumo

Embora *Mycobacterium tuberculosis*, o agente etiológico da tuberculose humana, seja a principal causa de micobacteriose no Homem, outras micobactérias não tuberculosas (MNT), podem também causar infecção em seres humanos, sendo cada vez mais frequentemente isoladas no laboratório de micobacteriologia. Dada a morosidade da identificação de MNT por métodos convencionais, torna-se essencial o desenvolvimento de métodos rápidos e fiáveis para a sua identificação.

Neste estudo foram comparados três métodos moleculares para a identificação de MNT, baseados na análise de restrição enzimática após amplificação de: (i) região rRNA 16S-23S “Internal Transcribed Spacer” (ITS), (ii) gene *hsp65*, e (iii) zona ITS e regiões adjacentes, 16S e 23S rDNA. Para este fim, avaliamos 50 isolados, correspondendo a 47 isolados clínicos de MNT e três estirpes de referência, representando as 11 espécies de MNT mais frequentemente isoladas no laboratório de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT, UNL) e uma estirpe referência de *M. tuberculosis*, e identificadas anteriormente utilizando o sistema comercial GenoType® Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience).

O PCR-RFLP do gene *hsp65* proporcionou os melhores resultados, identificando correctamente 42 dos 49 isolados de MNT, pertencentes a *M. avium*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. szulgai*, *M. peregrinum* e *M. xenopi*. O PCR-RFLP da região ITS identificou correctamente 28 dos 49 isolados testados, não distinguindo *M. intracellulare*/*M. scrofulaceum*, *M. avium*/*M. bohemicum* e *M. kansasii*/*M. szulgai*. Finalmente, o PCR-RFLP da região ITS e regiões adjacentes mostrou o pior desempenho, com apenas oito isolados correctamente identificados e falhando na amplificação de diversos isolados.

Dos três métodos testados, o PCR-RFLP do gene *hsp65* e da região ITS mostraram maior capacidade de identificação e reprodutibilidade. No entanto, a sua aplicação exige uma optimização cuidadosa das condições de análise e a sua aplicabilidade depende, em grande parte, da diversidade

de MNT em cada laboratório. Verificaram-se também várias dificuldades a nível da interpretação dos resultados.

Assim, apesar das vantagens referidas na literatura para estes três métodos, verificou-se que o grau de variabilidade e dificuldade de interpretação associados aos padrões obtidos, limitam a sua implementação no laboratório de diagnóstico de micobacteriologia.

## Abstract

Although *Mycobacterium tuberculosis*, the etiologic agent of human tuberculosis is the main cause of mycobacteriosis in Man, other nontuberculous mycobacteria (NTM), may also cause infection in humans, being increasingly isolated in the mycobacteriology laboratory. The NTM identification by conventional methods is time consuming, demanding for faster and reliable identification methods.

In this study we compared three molecular methods for the identification of NTM based on the restriction enzyme analysis of the amplification products of: (i) the 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer (ITS) region, (ii) the *hsp65* gene and (iii) the ITS and its flanking regions, 16S and 23S rDNA. For this purpose, we evaluated a collection of 50 isolates, comprising 47 clinical NTM isolates and three reference strains, representing the 11 NTM species most frequently isolated in the laboratory of Micobactérias, Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT, UNL) and one *M. tuberculosis* reference strain, and previously identified using the GenoType® Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience).

The method based in the PCR-RFLP of *hsp65* provided the best results, identifying correctly 42 of the 49 NTM isolates, corresponding to *M. avium*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. szulgai*, *M. peregrinum* and *M. xenopi*. The PCR-RFLP ITS identified correctly 28 of the 49 isolates tested. However, it could not distinguish between *M. intracellulare*/*M. scrofulaceum*, *M. avium*/*M. bohemicum* and *M. kansasii*/*M. szulgai*. Finally, the method based on the ITS and flanking regions showed the lowest identification performance, with only eight isolates correctly identified and failure to obtain amplification product for several isolates.

From the three methods tested, the PCR-RFLP of *hsp65* and ITS showed the highest identification capacity and reproducibility. However, their application requires a careful

optimization of the analysis conditions and their applicability depends largely on the NTM species diversity on each laboratory. We also experienced several difficulties on results interpretation.

In conclusion, in spite the advantages referred in the literature for these three methods, the variability associated with the patterns obtained and the difficulties in their interpretation limit the implementation of these methods in the mycobacteriology laboratory.



# I – INTRODUÇÃO

## 1. O género *Mycobacterium*

Hoje em dia os laboratórios de diagnóstico de micobactérias são confrontados com um aumento crescente destas bactérias, quer em termos de isolados, mas também em termos do número de espécies (Leão *et al.*, 2005; Russo *et al.*, 2006; Piersimoni & Scarparo, 2008). Estes laboratórios necessitam de identificar os vários isolados ao nível da espécie, com o objectivo de ajudar a definir a sua importância, classificando-o como verdadeiro patogéneo, contaminante ambiental ou potencial contaminante (Barreto *et al.*, 2000; Leão *et al.*, 2005; Katoch *et al.*, 2007). A identificação de um isolado é determinante para fornecer ao doente um tratamento adequado, dado que patologias provocadas por diferentes espécies de micobactérias envolvem diferentes riscos e requerem regimes terapêuticos específicos (Barreto *et al.*, 2000; Yam *et al.*, 2006).

A identificação de micobactérias é normalmente realizada através de métodos tradicionais (convencionais), que consistem na avaliação das características culturais e na realização de testes bioquímicos (Leão *et al.*, 2005; Katoch *et al.*, 2007). Embora a maioria destes testes seja simples de executar e não exija equipamento sofisticado, eles são contudo trabalhosos e muito demorados, já que estão dependentes do crescimento, atrasando deste modo a identificação (ou seja, o diagnóstico), o que pode levar a consequências sérias a nível clínico. Não obstante, estes testes permanecem e constituem o procedimento principal para a identificação de micobactérias na maioria dos laboratórios clínicos, especialmente nos de baixos recursos económicos (Leão *et al.*, 2005). Nos últimos anos verificou-se um aumento na descrição de novas espécies de micobactérias, devido aos recentes avanços na identificação e taxonomia, baseados num melhor conhecimento da genética das micobactérias.

A classificação das micobactérias iniciou-se em 1896 quando Lehmann e Neumann propuseram pela primeira vez o género *Mycobacterium*, no qual incluíram *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*. O género *Mycobacterium* foi inserido na família

Mycobacteriaceae, ordem Actinomycetales e na classe Actinomycetes, sendo o único género na família Mycobacteriaceae (Leão *et al.*, 2005; Saviola & Bishai, 2006; Jordan *et al.*, 2007).

A maioria das espécies das chamadas micobactérias não tuberculosas foi descrita no século passado. Em 1938, da Costa Cruz descreveu *Mycobacterium fortuitum* isolado num abcesso cutâneo (Leão *et al.*, 2005; Solar *et al.*, 2005). Uma década mais tarde, MacCallum e seus colaboradores descreveram uma doença de pele causada por uma nova espécie de *Mycobacterium*, classificado mais tarde como *Mycobacterium ulcerans* (Leão *et al.*, 2005). Em 1949, Cuttino e McCabe descreveram uma infecção disseminada numa criança, causada por um novo microrganismo que nomearam "*Nocardia intracellularis*", mais tarde re-classificado por Runyon como *Mycobacterium intracellulare*. Em 1951, Norden e Linell descreveram o "*Mycobacterium balnei*" presente num granuloma, posteriormente reconhecido como *Mycobacterium marinum*. Em 1953, Buhler e Pollak relataram uma doença pulmonar causada por um novo organismo álcool-ácido resistente que foi posteriormente nomeado de *Mycobacterium kansasii* (Leão *et al.*, 2005). Em 1956, Masson e Prissick descreveram uma micobactéria pigmentada (*Mycobacterium scrofulaceum*) que causava adenite cervical nas crianças.

Em 1954, Timpe e Runyon utilizaram pela primeira vez o termo "micobactérias não tuberculosas" (MNT) para identificar e diferenciar todas as micobactérias não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* e *M. leprae*, e em 1959 implementam a sua classificação, reconhecida hoje em dia por classificação de Runyon (Solar *et al.*, 2005). Com o avanço dos métodos e técnicas de identificação, muitas outras espécies de micobactérias foram entretanto descobertas e classificadas. Actualmente são reconhecidas 148 espécies e 11 subespécies dentro do género *Mycobacterium* (Euzéby), das quais aproximadamente cerca de 60 podem causar doença no Homem (Jarzembowski & Young, 2008; Wu, Lu & Lai, 2009).

O aumento do número de espécies de micobactérias descritas está em muito relacionado com os recentes avanços na identificação de micobactérias e na taxonomia, baseada principalmente no melhor conhecimento da genética de micobactérias (Leão *et al.*, 2005). Os progressos na

identificação estão relacionados com as melhorias nas técnicas microbiológicas para isolar as micobactérias não tuberculosas das amostras clínicas e com os avanços nas técnicas moleculares, em particular o desenvolvimento e a adopção da sequenciação do gene de 16S rRNA como método padrão para definir novas espécies (Griffith *et al.*, 2007).

As micobactérias são bacilos não móveis e aeróbios, embora algumas espécies e estirpes se possam desenvolver em condições microaerofílicas (Adékambi. & Drancourt, 2004; Leão *et al.*, 2005; Jordan *et al.*, 2007). Estes microrganismos dividem-se em patogénicos e saprófitos, podendo ser isolados de amostras clínicas, água, solo, de outras fontes ambientais, objectos, alimentos, tendo também já sido encontradas em material médico (endoscópios e soluções cirúrgicas) (Leão *et al.*, 2005; Sivasankari *et al.*, 2006; Jarzembowski & Young, 2008; Wu *et al.*, 2009).

As principais características das bactérias do género *Mycobacterium* são a presença da propriedade de álcool-ácido resistência (dai a sua denominação de bacilos álcool-ácido resistentes ou BAAR), a produção de ácidos micólicos e uma concentração elevada em guanina e citosina (conteúdo G+C) no seu DNA (Adékambi. & Drancourt, 2004; Leão *et al.*, 2005; Solar *et al.*, 2005; Saviola & Bishai, 2006; Jordan *et al.*, 2007).

## **2. Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e as micobactérias não tuberculosas**

Como já referido, género *Mycobacterium* é composto um elevado número de espécies, incluindo as pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* e as designadas de micobactérias não tuberculosas.

### **2.1 Complexo *Mycobacterium tuberculosis***

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é composto por *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium canettii*, além da estirpe da vacina *Mycobacterium bovis* BCG (Leão *et al.*, 2005; Piersimoni & Scarparo, 2008).

Recentemente, foi proposta a inclusão de novas espécies neste complexo, nomeadamente *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium pinnipedii* (Leão *et al.*, 2005).

A micobactéria com maior relevância neste complexo é *M. tuberculosis*. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2008, foram estimados cerca de 8,9 a 9,9 milhões novos casos de tuberculose, 1,1 a 1,7 milhões de mortes por tuberculose entre pessoas sem infecção por VIH e mais 0,45 a 0,62 milhões de mortes por tuberculose entre doentes VIH-positivos (World Health Organization, 2009).

A identificação do complexo *M. tuberculosis* é essencial para o diagnóstico da tuberculose. A diferenciação dos membros do complexo *M. tuberculosis* é necessária para o tratamento dos doentes (selecção da terapêutica adequada) e também é muito útil para fins epidemiológicos, em especial em áreas onde a tuberculose está presente em proporções epidémicas ou sempre que ocorra a transmissão de *M. bovis* entre os animais ou entre produtos animais e o homem (Parsons *et al.*, 2002).

A principal distinção entre o complexo *M. tuberculosis* e as restantes micobactérias patogénicas reside nas diferenças dos seus habitats e da sua propagação, bem como a susceptibilidade aos agentes quimioterapêuticos padrões (Piersimoni & Scarparo, 2008). A maior diferença entre tuberculose e outras micobacterioses é que o agente infeccioso *M. tuberculosis*, é transmitido de pessoa para pessoa através de aerossóis, sendo importante que o diagnóstico da tuberculose seja o mais rápido possível para interromper a sua propagação (Soini & Musser, 2001).

## **2.2 Micobactérias não tuberculosas**

As micobactérias não tuberculosas (MNT, ou NTM do inglês “nontuberculous mycobacteria”), são também designadas na literatura por micobactérias ambientais, micobactérias atípicas, outras micobactérias que não *Mycobacterium tuberculosis* (MOTT do inglês “mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*”) ou ainda micobactérias oportunistas (Gangadharam, 1980; Falkinham, 2003; Katoch, 2004; Primm, Lucero & Falkinham, 2004; Leite *et*

*al.*, 2005; Solar *et al.*, 2005; Sivasankari *et al.*, 2006; Marinho *et al.*, 2008). A designação de micobactérias “atípicas” foi utilizada pela primeira vez por Pinner, em 1935, referindo-se às características distintas que apresentavam em relação ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* e a *M. leprae*, em particular ao facto de não serem agentes patogénicos obrigatórios e de se encontrarem habitualmente no meio ambiente (Prather *et al.*, 1961; Katoch, 2004; Saiman, 2004; Hartmans, Bont & Stackebrandt; Jordan *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008). Nenhum destes termos foi universalmente aceite, mas a designação micobactérias não tuberculosas (MNT) parece ser o mais aceitável, sendo o adoptado pela American Thoracic Society (Katoch, 2004; Jordan *et al.*, 2007).

As micobactérias não tuberculosas podem ser encontradas como microrganismos saprófitos (na sua grande maioria), comensais, simbióticos ou potenciais patogénicos (oportunistas) (Dantec *et al.*, 2002; Primm *et al.*, 2004; Solar *et al.*, 2005; Sivasankari *et al.*, 2006; Hartmans *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2008; Hussein *et al.*, 2009). Estas micobactérias incluem espécies de crescimento lento (com formação de colónias em meio sólido a partir do sétimo dia de incubação) e espécies de crescimento rápido (com formação de colónias em meio sólido em menos de sete dias de incubação) (Falkinham, 2003; Primm *et al.*, 2004; Saviola & Bishai, 2006). É também importante realçar que as chamadas micobactérias de crescimento rápido, apresentam mesmo assim uma taxa de crescimento mais lento que a maioria das outras bactérias (Primm *et al.*, 2004).

Algumas das características partilhadas entre as micobactérias não tuberculosas (juntamente com as espécies complexo *M. tuberculosis*) são a sua elevada resistência aos antibióticos e desinfetantes, bem como a presença de ácidos micólicos na sua parede e a patogenicidade intracelular (Primm *et al.*, 2004).

As micobactérias não tuberculosas compreendem uma enorme diversidade de espécies e são responsáveis por uma grande variedade de sintomas e sinais clínicos (Jarzembowski & Young, 2008). Existem poucas evidências da possibilidade de transmissão directa de pessoa para pessoa, através de aerossóis (Gangadharam, 1980; Dantec *et al.*, 2002). Pensa-se que a infecção é adquirida

a partir do meio ambiente, através da ingestão, inalação de água, partículas ou aerossóis, ou inoculação (Dantec *et al.*, 2002; Falkinham, 2003; Hussein *et al.*, 2009), existindo relatos de infecções provocadas pela inadequada desinfecção de equipamentos médicos (Saiman, 2004; Vijayaraghavan *et al.*, 2006). Através de análise de DNA “fingerprints”, verificou-se que estripes de várias espécies recuperadas a partir de amostras ambientais (água, solo e aerossóis) eram idênticas às isoladas de vários doentes (Falkinham, 1996; Falkinham, 2003).

As micobactérias não tuberculosas isoladas de amostras clínicas eram inicialmente descritas como contaminantes das amostras clínicas, sendo desvalorizada a sua importância clínica, em muito devido à importância que a tuberculose apresentava na época (Jarzembowski & Young, 2008; Wu *et al.*, 2009). Contudo, nas últimas décadas, estes microrganismos têm vindo a apresentar um interesse crescente, principalmente devido à epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (Sivasankari *et al.*, 2006; Piersimoni & Scarparo, 2008).

Hoje em dia, as micobactérias não tuberculosas são reconhecidas como verdadeiros patogénicos e importantes causas de infecção para o Homem (Jarzembowski & Young, 2008), apresentando mais de 50 espécies associadas a doenças no ser humano (Jordan *et al.*, 2007). A diferenciação das micobactérias não tuberculosas do complexo *M. tuberculosis*, numa fase inicial do diagnóstico, é muito importante, pois o tratamento é distinto, devido às diferenças na susceptibilidade aos antibióticos (Kim *et al.*, 2006; Giampaglia *et al.*, 2007).

### **2.2.1 Ecologia das micobactérias não tuberculosas**

As micobactérias não tuberculosas são na sua grande maioria microrganismos geralmente no meio ambiente, cuja patogenicidade para o Homem varia entre a colonização e a doença (Gangadharam, 1980; Richard *et al.*, 1997; Leão *et al.*, 2005; Sivasankari *et al.*, 2006; Thavagnanam *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009). Consequentemente, a determinação do significado clínico da detecção de uma micobactéria não tuberculosa numa amostra clínica nem sempre é fácil e exige o conhecimento de critérios específicos (ponto 2.2.7).

As micobactérias não tuberculosas podem ser encontradas em ambientes naturais e sintéticos (produzidos pelo Homem). Em ambos os casos, os biofilmes podem ser importantes fontes de micobactérias não tuberculosas e serem responsáveis por “pseudo-infecções” e por doenças (Leão *et al.*, 2005).

### **Micobactérias isoladas a partir de ambientes naturais e sintéticos**

As micobactérias podem ser amplamente encontradas na natureza (Carson *et al.*, 1978; Leão *et al.*, 2005; Solar *et al.*, 2005; Al-Mahruqi *et al.*, 2009). As micobactérias não tuberculosas estão presentes numa grande variedade de reservatórios ambientais, incluindo a água, solo, aerossóis, poeiras, protozoários, animais e no Homem (Carson *et al.*, 1978; Stauffer *et al.*, 1998; Dantec *et al.*, 2002; Falkinham, 2003; Primm *et al.*, 2004; Solar *et al.*, 2005; Hartmans *et al.*, 2006). Na sua maioria, estas micobactérias habitam no solo, mas estão igualmente presentes na água doce e salgada (mar). O Homem está regularmente em contacto com micobactérias não tuberculosas, ao inalar ou ingerir partículas do ambiente, água ou alimentos contaminados (Primm *et al.*, 2004; Leão *et al.*, 2005; Marinho *et al.*, 2008; Hussein *et al.*, 2009). Consequentemente, a colonização temporária ou permanente do nosso tracto respiratório ou digestivo por estes organismos é muito comum, podendo contudo ser também encontrados na pele (Leão *et al.*, 2005).

Segundo Leão *et al.* (2005), é importante diferenciar os ambientes naturais dos ambientes influenciados pelo Homem (abastecimentos de água, chuveiros, piscinas, aquários, esgotos, entre outros), como nichos ecológicos de micobactérias. Assim, determinadas espécies são muito mais comuns na natureza, enquanto outras são encontradas na sua maioria em ambientes sintéticos, (Leão *et al.*, 2005).

Os chamados ambientes sintéticos são colonizados por um espectro considerável de espécies de micobactérias, algumas das quais vivem quase exclusivamente em habitats sintéticos. *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium xenopi* não foram até à data isolados a partir de um ambiente natural, mas têm sido frequentemente isolados a partir de fontes de água para consumo e

água de esgotos (Leão *et al.*, 2005; Hussein *et al.*, 2009). Os seus reservatórios naturais são ainda desconhecidos (Leão *et al.*, 2005).

Segundo Leão *et al.* (2005), *Mycobacterium haemophilum* e *Mycobacterium genavense* são também exemplos de espécies ainda não isoladas a partir da natureza, embora a epidemiologia das doenças por elas provocadas sugira a sua presença no ambiente. Outras espécies, tais como *Mycobacterium gordonae*, são comuns tanto em ambientes naturais como sintéticos (Leão *et al.*, 2005).

Mais de 20 espécies de micobactérias não tuberculosas já foram isoladas a partir de sistemas de água potável (Hussein *et al.*, 2009). A predominância de muitas espécies de micobactérias não tuberculosas na água canalizada é explicada pela sua elevada resistência aos desinfetantes mais comuns (como por exemplo o cloro) e a sua tolerância a variações amplas de pH e temperatura, o que permite a colonização, sobrevivência e crescimento na água canalizada (Dantec *et al.*, 2002; Primm *et al.*, 2004; Hussein *et al.*, 2009). Adicionalmente, o tratamento do abastecimento de água com ozono ou cloro pode levar a uma alteração na população bacteriana, levando ao predomínio das micobactérias não tuberculosas na rede de água pública (Primm *et al.*, 2004; Hussein *et al.*, 2009), entre as quais se podem destacar determinadas espécies, de acordo com as diferentes susceptibilidades das espécies de micobactérias aos desinfetantes (Primm *et al.*, 2004). Além disso, como já foi referido anteriormente, as micobactérias não tuberculosas apresentam a capacidade de formar biofilmes, podendo deste modo persistir no meio ambiente (Primm *et al.*, 2004; Hussein *et al.*, 2009). As espécies mais termo-resistentes, tais como as pertencentes ao complexo *Mycobacterium avium*, *M. xenopi*, *Mycobacterium phlei*, *M. scrofulaceum* e *Mycobacterium chelonae* são tolerantes a temperaturas extremas, o que conduz à contaminação de canalizações de água quente nos hospitais e de termas, bem como de máquinas de gelo (Richard *et al.*, 1997; Primm *et al.*, 2004; Hussein *et al.*, 2009). *Mycobacterium mucogenicum*, *M. kansasii*, *M. gordonae* e *Mycobacterium flavescens* estão entre as espécies de micobactérias não tuberculosas que foram mais frequentemente isoladas a partir de água potável (Primm *et al.*, 2004). Por outro lado, *M.*



*marinum* é frequentemente associado a água salgada, água doce, aquários e piscinas (Richard *et al.*, 1997).

Existe uma variedade de situações onde o Homem e as distribuições geográficas e ambientais das micobactérias se podem sobrepor e conduzir à exposição do Homem a estas bactérias. Uma das principais sobreposições ocorre quando o homem é exposto às micobactérias presentes na água, ao beber, nadar e durante a sua higiene (Piersimoni & Scarparo, 2008).

## **Biofilmes**

Segundo Donlan (2002), um biofilme é uma estrutura de células microbianas, irreversivelmente associada com uma superfície, onde estas células se multiplicam e produzem uma matriz extracelular com propriedades adesivas.

Os biofilmes podem formar-se nas mais diversas superfícies, nos quais se incluem os tecidos vivos, equipamentos hospitalares, nos sistemas de água potável ou industrial, ou ainda em sistemas aquáticos naturais (Donlan, 2002).

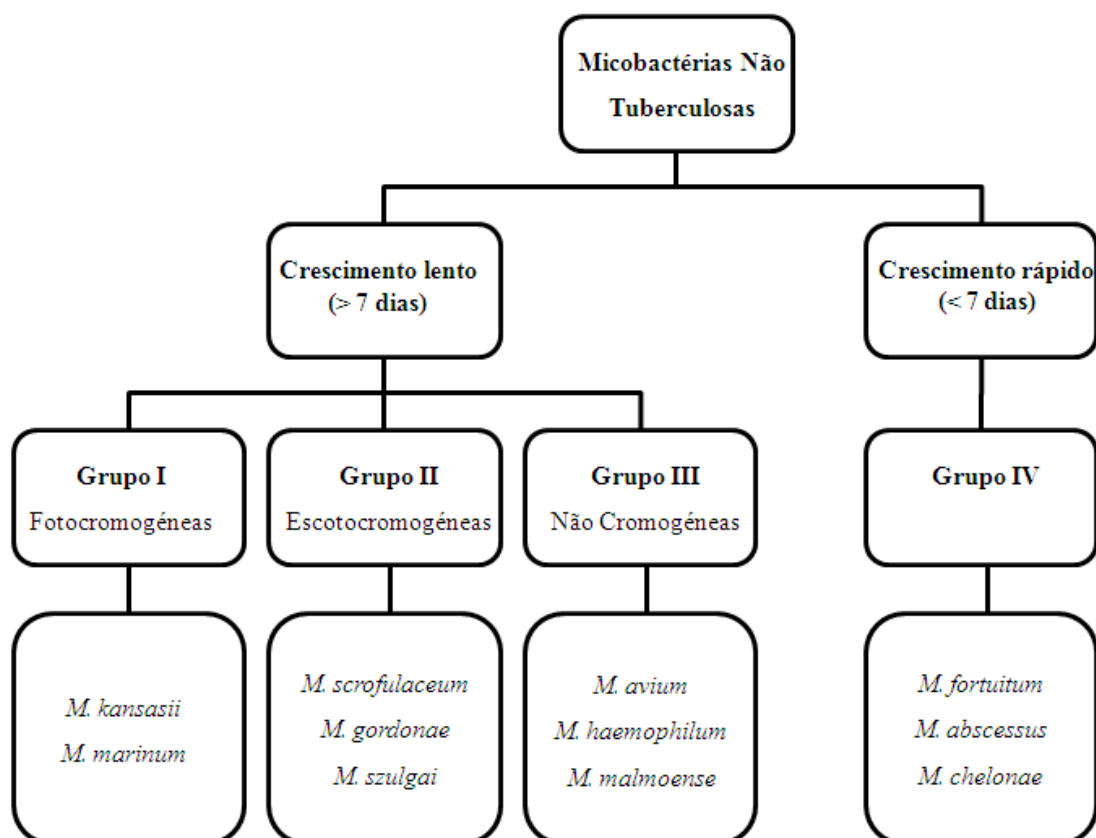
A elevada hidrofobicidade das micobactérias e a sua resistência aos antibióticos, desinfetantes e metais pesados, permitem a formação dos biofilmes numa variedade de superfícies orgânicas (plásticos, borracha, silicone, celulose entre outras) e superfícies inorgânicas (cobre, vidro, etc.) (Leão *et al.*, 2005). Foram já descritos biofilmes contendo micobactérias tanto em ambientes sintéticos, como em sistemas naturais, embora os biofilmes em ambientes naturais sejam menos documentados (Leão *et al.*, 2005).

Os biofilmes podem ser fontes importantes de micobactérias não tuberculosas. No entanto, a função protectora dos biofilmes em relação às micobactérias não tuberculosas contra factores ambientais agressivos e em alguns casos, na promoção do seu crescimento, ainda não está bem caracterizada (Leão *et al.*, 2005). A presença de micobactérias não tuberculosas nos biofilmes pode consequentemente apresentar um impacto na saúde do homem, pois elas podem ser responsáveis por problemas de contaminação e doenças (Leão *et al.*, 2005).

## **2.2.2 Sistemas de classificação das micobactérias não tuberculosas**

### **2.2.2.1 Classificação de Runyon**

Tradicionalmente, as micobactérias não tuberculosas são agrupadas em quatro grupos, de acordo com o chamado sistema de Runyon (Figura 1) (Gangadharam, 1980; Solar *et al.*, 2005 Jarzembowski & Young, 2008). Nesta classificação, inicialmente proposta por Timpe e Runyon nos anos 50 do século passado (Piersimoni & Scarparo, 2008) as micobactérias não tuberculosas são divididas com base na sua taxa de crescimento e produção de pigmento (Gangadharam, 1980; Solar *et al.*, 2005 Sivasankari *et al.*, 2006; Jarzembowski & Young, 2008; Piersimoni & Scarparo, 2008). Assim, os grupos I a III compreendem as micobactérias de crescimento lento (detectáveis em meio sólido a partir de sete dias), enquanto que o grupo IV é constituído por micobactérias de crescimento rápido (detectáveis em meio sólido em menos de sete dias) (Gangadharam, 1980; Adékambi. & Drancourt, 2004; Jarzembowski & Young, 2008). As micobactérias não tuberculosas de crescimento lento estão subdivididas em 3 grupos, encontrando-se no grupo I as fotocromogéneas (produtoras de pigmentos apenas na presença da luz), no grupo II as escotocromogéneas (produtoras de pigmentos na ausência de luz) e no grupo III as não cromogéneas (não produtoras de pigmentos) (Gangadharam, 1980; Jarzembowski & Young, 2008).



**Figura 1. Classificação de micobactérias não tuberculosas segundo o sistema de Runyon.** São apresentadas algumas espécies exemplificativas de cada um dos grupos (Adaptado de Leão *et al.*, 2005).

#### 2.2.2.2 Classificação baseada em grupos de risco

Segundo Leão e os seus colaboradores (2005), a classificação dos microrganismos baseada em grupos de risco também pode ser utilizada para classificar as micobactérias. Esta classificação é baseada no risco de infecção que as diferentes espécies de micobactérias representam para o Homem, agrupando-as em três grupos de risco (Tabela 1) (Leão *et al.*, 2005). Contudo, nem todas as espécies estão ainda classificadas segundo esta classificação.

**Tabela 1. Classificação das espécies micobactérias de acordo com o risco de infecção para o Homem** (adaptado de Leão *et al.*, 2005).

Grupo de risco 1		Grupo de risco 2	Grupo de risco 3
<i>M. agri</i>	<i>M. komossense</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<i>M. aichiense</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. asiaticum</i>	<i>M. bovis</i>
<i>M. alvei</i>	<i>M. lepraemurium</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. africanum</i>
<i>M. aurum</i>	<i>M. madagascariense</i>	<i>M. celatum</i>	<i>M. microti</i>
<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. leprae</i>
<i>M. branderi</i>	<i>M. moriokaense</i>	<i>M. fortuitum</i>	
<i>M. brumae</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. haemophilum</i>	
<i>M. chitae</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. intracellulare</i>	
<i>M. chlorophenolicum</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. kansasii</i>	
<i>M. chubuense</i>	<i>M. obuense</i>	<i>M. malmoense</i>	
<i>M. confluens</i>	<i>M. parafortuitum</i>	<i>M. genavense</i>	
<i>M. conspicuum</i>	<i>M. phlei</i>	<i>M. marinum</i>	
<i>M. cookii</i>	<i>M. porcinum</i>	<i>M. peregrinum</i>	
<i>M. diernhoferi</i>	<i>M. poriferae</i>	<i>M. paratuberculosis</i>	
<i>M. duvalii</i>	<i>M. pulveris</i>	<i>M. shimoidei</i>	
<i>M. fallax</i>	<i>M. rhodesiae</i>	<i>M. simiae</i>	
<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. senegalense</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	
<i>M. flavescens</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. szulgai</i>	
<i>M. gadium</i>	<i>M. sphagni</i>	<i>M. ulcerans</i>	
<i>M. gastri</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. xenopi</i>	
<i>M. gilvum</i>	<i>M. thermoresistibile</i>		
<i>M. gordonae</i>	<i>M. tokaiense</i>		
<i>M. hassiacum</i>	<i>M. triplex</i>		
<i>M. hiberniae</i>	<i>M. triviale</i>		
<i>M. hodleri</i>	<i>M. vaccae</i>		
<i>M. interjectum</i>			

**Grupo de risco 1:** Baixo risco de infecção tanto para o indivíduo como para a comunidade. Doença nunca ou raramente descrita em adultos normais. As espécies geralmente são classificadas como agentes patogénicos raros.

**Grupo de risco 2:** Risco individual moderado, o risco na comunidade é limitado. As espécies indicadas são geralmente classificadas como potenciais agentes patogénicos ou oportunistas.

**Grupo de risco 3:** Risco de transmissão pelo ar. A doença após infecção é geralmente severa e por vezes fatal. Elevado risco individual, mas moderado para a comunidade. As espécies descritas são geralmente classificadas como estritamente patogénicas.

### 2.2.3 Complexos de espécies de micobactérias não tuberculosas

No género *Mycobacterium* existem algumas espécies de micobactérias com relações muito próximas entre si, as quais se encontram agrupadas por complexo de espécies. Os complexos de espécies de micobactérias não tuberculosas mais importantes são o complexo *M. avium* (MAC), o complexo *M. fortuitum*, complexo *M. chelonae-abscessus*, complexo *Mycobacterium terrae*, complexo *Mycobacterium simiae* e complexo *Mycobacterium smegmatis*.

### **Complexo *M. avium***

As espécies de micobactérias incluídas no complexo *M. avium* (MAC, de “*M. avium* complex”) são de crescimento lento (Inderlied *et al.*, 1993). O MAC é composto por patógenos oportunistas capazes de causar doenças em animais e nos seres humanos (Inderlied *et al.*, 1993; Turenne, Wallace & Behr, 2007). O MAC inclui as espécies *M. avium* e *M. intracellulare*. Dentro da espécie *M. avium* foram propostas as subespécies *M. avium subsp. avium*, *M. avium subsp. silvaticum*, *M. avium subsp. paratuberculosis* e *M. avium subsp. hominissuis* (Turenne *et al.*, 2008). Assim a existência de novas variantes de *M. avium* são esperadas, colocando novos desafios em termos de taxonomia, mas também no seu diagnóstico (Turenne *et al.*, 2007). Em hospedeiros imunocompetentes, o MAC ocorre principalmente como patógeno respiratório, especialmente em indivíduos com doença pulmonar obstrutiva crônica e pode causar fibrose pulmonar ou doença pulmonar cavitária, enquanto que em hospedeiros imunodeprimidos pode originar infecção sistêmica (Bannalikal & Verma, 2006).

A maioria das infecções causadas em doentes com SIDA, são devido a *M. avium* (Leão *et al.*, 1999; Leão *et al.*, 2005), causando sobretudo doença dessiminada (Inderlied *et al.*, 1993). Por outro lado, *M. intracellulare* é detectado com maior frequência em doentes sem SIDA (Leão *et al.*, 2005). Por esta razão, a diferenciação entre as duas espécies é recomendada, especialmente no contexto da SIDA (Leão *et al.*, 2005).

*M. avium* normalmente é isolado de ambientes sintéticos como água potável, que se acredita ser uma fonte de infecção para os doentes com SIDA (Leão *et al.*, 2005).

### **Complexo *M. fortuitum***

O complexo *M. fortuitum* inclui três táxons: *M. fortuitum*, *M. peregrinum* e complexo terceira biovariante (Sharbati *et al.*, 2009). A partir do complexo terceira biovariante foi proposta a inclusão neste complexo de novas espécies tais como *M. neworleansense*, *M. houstonense*, *M. conceptionense*, *M. brisbanense* e *M. boenickei*, bem como as espécies já anteriormente descritas na

literatura como *M. septicum* e *M. mageritense* (Brown-Elliott & Wallace, 2002, Schinsky *et al.*, 2004). O complexo *M. fortuitum* inclui ainda *M. mucogenicum*, *M. senegalense* e *M. porcinum* (Brown-Elliott & Wallace, 2002, Schinsky *et al.*, 2004; Wallace *et al.*, 2004).

O complexo *M. fortuitum* está envolvido em 60% das infecções cutâneas causadas por micobactérias de crescimento rápido nos indivíduos imunocompetentes, sendo raramente causa de doença pulmonar (Sharbati *et al.*, 2009). A maioria ou todos os casos de infecções adquiridas na comunidade ou doenças associadas aos cuidados de saúde causadas pelo complexo *M. fortuitum* são devidos *M. fortuitum* (Sharbati *et al.*, 2009). Esta espécie, basicamente, causa lesões de pele, infecções de feridas, abscessos, infecções de lesões pós-cirúrgicas em hospedeiros previamente saudáveis. Pouco se sabe sobre os mecanismos de virulência e persistência deste agente patogénico no Homem (Sharbati *et al.*, 2009).

### **Complexo *M. chelonae-abscessus***

O complexo *M. chelonae-abscessus* é constituído por três espécies: *M. chelonae*, *M. abscessus* e *M. immunogenum* (Brown-Elliott & Wallace, 2002; Kim *et al.*, 2008).

No entanto, a situação é complexa para os microbiologistas clínicos que pretendam identificar rápida e correctamente os isolados (Kim *et al.*, 2008). Dois grupos de *M. abscessus* (grupos I e II) foram descritos com base no PCR-RFLP do gene *hsp65* e também através da análise da sequência do gene *hsp65* (Kim *et al.*, 2008). A elevada heterogeneidade de *M. abscessus* também foi confirmada pela análise do gene *rpoB*.

Em 2001 foi descrita uma nova espécie, *M. immunogenum*, a qual foi isolada pela primeira vez em fluídos utilizados para a lubrificação e arrefecimento de máquinas industriais, sendo apenas identificada através de métodos moleculares (Brown-Elliott & Wallace, 2002; Viana-Niero *et al.*, 2008).

### **Complexo *M. terrae***

O complexo *M. terrae* é composto por *M. terrae*, *M. nonchromogenicum* e *M. triviale*. A colonização do epitélio humano por estas micobactérias é rara e geralmente são consideradas como não patogénicas (Lee *et al.*, 2004). No entanto, *M. nonchromogenicum* pode ocasionalmente causar doenças no Homem, tais como infecções pulmonares e tendinopatia (Lee *et al.*, 2004). Nos últimos anos, um número crescente de infecções causadas por estes organismos foram diagnosticados, em particular infecções oportunistas em doentes com SIDA (Vanitha *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004).

### **Complexo *M. simiae***

O complexo *M. simiae* é composto por várias espécies filogeneticamente relacionadas, nas quais se incluem *M. simiae*, *Mycobacterium triplex*, *M. genavense*, *Mycobacterium heidelbergense* e *Mycobacterium lentiflavum*. Destas, a espécie mais frequentemente associada com patologias humanas é *M. simiae* (Cruz, Goytia & Starke, 2007).

### **Complexo *M. smegmatis***

O complexo *M. smegmatis* é composto actualmente por *M. smegmatis* “*sensu stricto*” e pelas espécies recentemente descritas *Mycobacterium wolinskyi* e *Mycobacterium goodii*. As três espécies são separadas com base na susceptibilidade à tobramicina, com cerca de 90% precisão (Brown-Elliott & Wallace, 2002).

#### **2.2.4 Patogenia**

As doenças clínicas mais comuns provocadas por micobactérias não tuberculosas são a linfadenite, doenças cutâneas, doenças disseminadas e doenças pulmonares (Tabela 2) (Griffith *et al.*, 2007).

**Tabela 2. Patogenias mais comuns provocadas por micobactérias não tuberculosas** (adaptado de Griffith *et al.*, 2007).

Patogenia	Espécies etiológicas comuns	Espécies etiológicas não comuns
Pulmonar	Complexo <i>M. avium</i> (MAC) <i>M. kansasii</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. malmoense</i>	<i>M. simiae</i>
		<i>M. szulgai</i>
		<i>M. fortuitum</i>
		<i>M. celatum</i>
		<i>M. asiaticum</i>
		<i>M. shimoidei</i>
		<i>M. haemophilum</i>
		<i>M. smegmatis</i>
		<i>M. chelonae</i>
		<i>M. scrofulaceum</i>
Linfadenite	Complexo <i>M. avium</i> (MAC) <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. malmoense</i>	<i>M. fortuitum</i>
		<i>M. chelonae</i>
		<i>M. abscessus</i>
		<i>M. genavense</i>
		<i>M. kansasii</i>
		<i>M. haemophilum</i>
Doenças de pele, tecidos moles e ossos	<i>M. marinum</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. ulcerans</i>	<i>M. szulgai</i>
		Complexo <i>M. avium</i> (MAC)
		<i>M. kansasii</i>
		<i>M. nonchromogenicum</i>
		<i>M. smegmatis</i>
		<i>M. haemophilum</i>
		<i>M. immunogenum</i>
		<i>M. malmoense</i>
		<i>M. szulgai</i>
		Complexo <i>M. terrae</i>
Disseminada	Complexo <i>M. avium</i> (MAC) <i>M. kansasii</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. haemophilum</i>	<i>M. abscessus</i>
		<i>M. celatum</i>
		<i>M. xenopi</i>
		<i>M. malmoense</i>
		<i>M. immunogenum</i>
		<i>M. genavense</i>
		<i>M. simiae</i>
		<i>M. conspicuum</i>
		<i>M. marinum</i>
		<i>M. mucogenicum</i>
		<i>M. fortuitum</i>
		<i>M. scrofulaceum</i>
		<i>M. szulgai</i>

As micobactérias não tuberculosas podem infectar uma grande variedade de locais do corpo humano, incluindo diferentes órgãos. O trato respiratório é o alvo mais frequente (Richard *et al.*, 1997; Tortoli, 2004). A doença pulmonar crónica é a manifestação clínica mais comum entre as doenças causadas por micobactérias não tuberculosas nos adultos, sendo seguida pelas doenças nos



ossos, articulações e tendões (Falkinham, 1996; Richard *et al.*, 1997; Piersimoni & Scarparo, 2008). Os locais de infecção mais frequentes nas crianças são a pele e os nódulos linfáticos (Falkinham, 1996; Richard *et al.*, 1997; Piersimoni & Scarparo, 2008). A doença pulmonar crónica tem como agentes patogénicos mais frequentes as micobactérias que pertencem ao complexo *M. avium*, seguidas por *M. kansasii*, sendo as suas características clínicas muito semelhantes às da tuberculose (Griffith *et al.*, 2007).

As infecções causadas por *M. haemophilum* ou *M. chelonae* são geralmente caracterizadas por nódulos subcutâneos ou abscessos. Em indivíduos imunocompetentes, as infecções causadas pelas micobactérias não tuberculosas na pele, junções, tendões e nos ossos estão frequentemente associadas com traumatismos ou feridas cirúrgicas (Falkinham, 1996). Por outro lado, em doentes com SIDA ou imunodeprimidos, a infecção é frequentemente disseminada (Falkinham, 1996).

#### **2.2.5 Aumento da incidência das infecções por micobactérias não tuberculosas**

Primm e seus colaboradores em 2004 previram um aumento da incidência das interacções entre o Homem e as micobactérias, que provavelmente resultará em mais casos de infecção por micobactérias não tuberculosas. Entre os principais factores que levam ao aumento das infecções por micobactérias não tuberculosas contam-se os seguintes: (i) os habitats ocupados por micobactérias não tuberculosas (por exemplo, água potável) são também compartilhados pelo Homem; (ii) a desinfecção da água para consumo com cloro (selecção das micobactérias pela redução da competição); (iii) a deficiente desinfecção nos actos médicos e industriais (selecção de micobactérias); (iv) melhor reconhecimento dos sintomas clínicos associados a estas micobacterioses e (v) aumento da percentagem da população com predisposição para ser infectada, especialmente os indivíduos com SIDA, idosos e imunodeprimidos, como os transplantados (Falkinham, 2003; Primm *et al.*, 2004; Iwen *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009).

## **2.2.6 Contribuição da SIDA no aumento das infecções provocadas por micobactérias não tuberculosas**

O interesse pelas doenças provocadas por micobactérias não tuberculosas mudou radicalmente com a emergência global da epidemia da SIDA, em particular com os primeiros relatórios de doenças provocadas por micobactérias não tuberculosas em doentes com SIDA (Falkinham, 1996). A epidemia da SIDA teve um impacto directo na importância das doenças provocadas por micobactérias não tuberculosas (Stauffer *et al.*, 1998; Dantec *et al.*, 2002; Tortoli, 2004; Sivasankari *et al.*, 2006; Thavagnanam *et al.*, 2006). Antes da epidemia da SIDA, e ainda hoje em indivíduos imunocompetentes, a doença provocada por micobactérias não tuberculosas é principalmente pulmonar (Dantec *et al.*, 2002; Tortoli, 2004; Sivasankari *et al.*, 2006; Thavagnanam *et al.*, 2006). A maioria destes doentes apresenta condições de predisposição como pneumoconiose, doença pulmonar obstrutiva crónica, ou trabalho em condições onde são expostos a poeiras, entre outros factores. As outras micobacterioses nestes tipos de doentes, estão confinadas aos nódulos linfáticos cervicais, pele, e apenas em casos muito raros, infecção disseminada (Falkinham, 1996; Falkinham, 2003).

Por outro lado, como já foi referido, em doentes com SIDA e em indivíduos imunodeprimidos, a doença provocada pelas micobactérias não tuberculosas é geralmente disseminada (Dantec *et al.*, 2002; Sivasankari *et al.*, 2006; Thavagnanam *et al.*, 2006). Por outro lado, a infecção provocada por micobactérias não tuberculosas é um dos critérios utilizados para o diagnóstico da SIDA em doentes com HIV (Dantec *et al.*, 2002).

O impacto das micobactérias não tuberculosas na morbilidade e mortalidade dos doentes com SIDA, estimulou o início de estudos relativos à epidemiologia, ecologia, genética, biologia molecular e fisiologia das micobactérias não tuberculosas (Falkinham, 1996; Falkinham, 2003). Além, disso a rápida ascensão das doenças provocadas por micobactérias não tuberculosas estimularam o desenvolvimento de métodos rápidos para o seu isolamento e identificação (Falkinham, 1996).

### 2.2.7 Significado clínico da detecção de micobactérias em amostras clínicas

Os agentes patogénicos estritos identificados nas amostras clínicas são quase sempre responsáveis pela doença, o que não é o caso das espécies potencialmente patogénicas ou saprófitas, cuja presença não conduz sistematicamente à doença (Leão *et al.*, 2005). Segundo Leão *et al.* (2005) a presença de micobactérias não tuberculosas numa amostra clínica pode ter três significados:

(i) A micobactéria é o agente etiológico, e neste caso o diagnóstico microbiológico deve ser suportado por sinais clínicos e pelo isolamento repetido desta micobactéria no mesmo doente, ou por um único isolamento no caso das amostras colhidas de forma asséptica;

(ii) A micobactéria colonizou a amostra mas não tem significado clínico. Isto resulta frequentemente da utilização de equipamento contaminado com micobactérias, geralmente provenientes de água canalizada. Este fenómeno não é raro e causa o que é designado de "pseudo-infecção";

(iii) A detecção de micobactérias na amostra clínica tem origem numa contaminação do laboratório (soluções de descontaminação contaminadas ou contaminação devido a outra amostra positiva), sendo fácil de verificar, caso a mesma micobactéria seja isolada a partir de outras amostras analisadas no mesmo dia.

Segundo a American Thoracic Society, a avaliação mínima de um paciente com suspeita de doença pulmonar provocada por micobactérias não tuberculosas deve incluir os seguintes procedimentos: a realização de uma radiografia ao tórax, ou na ausência de cavitação, deve-se realizar tomografia computadorizada de alta resolução do tórax, devem ser colhidas três ou mais amostras de expectoração para pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes, e a exclusão de outras doenças, tais como a tuberculose (Griffith *et al.*, 2007).

Os critérios clínicos, radiográficos e microbiológicos são igualmente importantes e todos devem ser tidos em conta ao fazer um diagnóstico de doença pulmonar provocada por micobactérias

não tuberculosas (Griffith *et al.*, 2007). Os critérios seguintes aplicam-se aos pacientes sintomáticos com opacidades, nódulos ou cavidades visíveis na radiografia, ou tomografia computadorizada de alta resolução do tórax que apresente bronquiectasias multifocais, com múltiplos pequenos nódulos (Tabela 3) (Griffith *et al.*, 2007). Estes critérios aplicam-se melhor ao complexo *M. avium*, *M. kansasii* e *M. abscessus*. Não há ainda conhecimento suficiente sobre as restantes espécies de micobactérias não tuberculosas para se ter a certeza de que estes critérios de diagnóstico são universalmente aplicáveis para todas as micobactérias não tuberculosas que causam infecção no trato respiratório (Griffith *et al.*, 2007).

**Tabela 3. Critérios de diagnósticos de micobactérias não tuberculosas para doenças pulmonares** (adaptado de Griffith *et al.*, 2007).

Contexto Clínico	Critérios Microbiológicos
<p>1. Sintomas pulmonares, opacidades nodulares ou cavitárias na radiografia do tórax, ou uma HRCT<sup>(a)</sup> que revele bronquiectasias multifocal, com múltiplos pequenos nódulos.</p> <p>e</p> <p>2. Exclusão apropriada de outros diagnósticos.</p>	<p>1. Culturas positivas de pelo menos duas amostras de expectoração em separado. (Se os resultados das expectorações iniciais não permitir diagnóstico, considerar repetir baciloscopia para pesquisa de BAAR e cultura).</p> <p>ou</p> <p>2. Resultado positivo de cultura de pelo menos uma lavagem brônquica.</p> <p>ou</p> <p>3. Transbrônquica ou a biópsia pulmonar com características histopatológicas de micobactérias (inflamação granulomatosa ou BAAR) e cultura positiva para MNT ou biópsia mostrando características histopatológicas da presença de micobactérias (inflamação granulomatosa ou BAAR) e cultura positiva para MNT a partir de uma ou mais amostras de expectoração ou de lavagem brônquica.</p> <p>4. A consulta de especialistas deve ser realizada quando MNT são recuperados de locais onde são raramente encontradas ou quando geralmente representam uma contaminação ambiental.</p> <p>5. Os doentes que estão com suspeita de doença pulmonar provocada por MNT, mas que não apresentem os critérios diagnósticos, devem ser seguidos até que o diagnóstico esteja firmemente estabelecido ou excluído.</p>

<sup>(a)</sup> HRCT - high-resolution computed tomography.

### **3. Identificação de micobactérias não tuberculosas**

O elevado número de espécies de micobactérias não tuberculosas até hoje identificadas, leva a que os laboratórios procurem desenvolver e/ou aplicar métodos mais eficientes e rápidos para a detecção e caracterização de micobactérias, incluindo métodos de cultura mais sensíveis, melhoramento das técnicas para identificação e dos testes de susceptibilidade aos antibióticos. Por outro lado, é importante que os laboratórios recebam as amostras colhidas correctamente (Piersimoni & Scarparo, 2008). Como diferentes espécies de micobactérias apresentam diferentes susceptibilidades aos antibióticos, é crucial que a identificação seja precisa, para a adopção de uma terapia correcta (da Silva *et al.*, 2001).

#### **3.1 Métodos de identificação convencionais**

O diagnóstico inicial de uma micobacteriose é frequentemente baseado em dados clínicos, mas o diagnóstico definitivo geralmente envolve o isolamento e a identificação do microrganismo em laboratório (Soini & Musser, 2001). O procedimento normalmente utilizado no laboratório para analisar as amostras clínicas envolve a descontaminação da amostra, o exame microscópico para verificação da presença de bacilos álcool-ácido resistentes, utilizando a coloração de Ziehl-Neelsen, isolamento do microrganismo através de cultura e a sua identificação (da Silva *et al.*, 2001; Soini & Musser, 2001). O exame microscópico é um procedimento rápido, económico, fácil de executar, fornece informações preliminares importantes sobre a possível presença de micobactérias, mas não é útil para identificar as micobactérias ao nível da espécie, sendo a sua sensibilidade menor que a da cultura (Hashimoto *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2009). Portanto não é só importante detectar micobactérias, mas também identificá-las ao nível da espécie. Assim, a identificação de um isolado clínico é normalmente realizada através das suas características culturais (morfologia das colónias e sua pigmentação), temperatura e taxa de crescimento e dos resultados obtidos nos testes bioquímicos (Kahana, Richardson & Cole, 1975; Barreto *et al.*, 2000; Kellogg *et al.*, 2001; Deepa, Therese, & Madhavan, 2005; Yam *et al.*, 2006). Devido à lenta taxa de crescimento das

micobactérias, os processos de isolamento e de identificação podem levar várias semanas (Soini & Musser, 2001).

Além de morosas, as identificações efectuadas apenas através de métodos convencionais, são consideradas difíceis, envolvendo por vezes procedimentos complexos e falta de reprodutibilidade, o que leva a atrasos significativos no diagnóstico (Kirschner *et al.*, 1993; Kellogg *et al.*, 2001; Deepa *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2005, Yam *et al.*, 2006, Griffith *et al.*, 2007). Apesar de muitos testes tradicionais (convencionais) para a identificação de micobactérias já não se usarem na rotina dos laboratórios, a taxa de crescimento e a pigmentação são ainda muito úteis para a uma classificação prévia de micobactérias não tuberculosas, podendo auxiliar a orientação e selecção dos procedimentos adequados para a sua identificação (Kellogg *et al.*, 2001; Deepa, *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2005, Yam *et al.*, 2006, Griffith *et al.*, 2007). No entanto, a utilização exclusiva dos métodos convencionais não permite a identificação de muitas espécies recentemente descritas, devendo ser utilizados métodos mais recentes, como a cromatografia líquida de alta performance (HPLC de “high performance liquid chromatography”) baseada na análise de ácidos micólicos ou métodos moleculares (Lee *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2005; Griffith *et al.*, 2007).

Os métodos convencionais, para além de serem trabalhosos e morosos, podem fornecer resultados ambíguos ou mesmo errados que podem ser explicados pela convergência de uma série de características (Kirschner *et al.*, 1993; Barreto *et al.*, 2000; Kellogg *et al.*, 2001; Mijs *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2005; Yam *et al.*, 2006). A variabilidade de estirpes presentes numa mesma espécie, pode levar a uma variabilidade nos resultados dos testes bioquímicos, podendo também ocorrer espécies diferentes com morfologias e perfis bioquímicos indistinguíveis ou muito idênticos (Kirschner *et al.*, 1993; Barreto *et al.*, 2000; Kellogg *et al.*, 2001; Yam *et al.*, 2006). Assim sendo o fenótipo de uma espécie não é propriedade absoluta podendo apresentar uma variabilidade fenotípica bastante notável (Kirschner *et al.*, 1993). Por outro lado os laboratórios necessitam de pessoal com formação e ampla experiência para executar correctamente muitos destes ensaios (Kellogg *et al.*, 2001). Outra limitação dos métodos convencionais está na identificação apenas das

espécies de micobactérias mais comuns, pois as suas propriedades e características já foram totalmente documentadas (Kellogg *et al.*, 2001; Yam *et al.*, 2006). Assim sendo, várias espécies de micobactérias, em particular as de mais recentemente descritas, não podem ser identificadas utilizando apenas os testes bioquímicos (Kellogg *et al.*, 2001).

### 3.1.1 Temperatura óptima de crescimento

Os laboratórios devem declarar no seu relatório, o tempo de crescimento das micobactérias, pois permite diferenciar espécies de crescimento lento das espécies de crescimento rápido (Griffith *et al.*, 2007). A temperatura óptima para a maioria das culturas de micobactérias não tuberculosas situa-se entre 28°C e 37°C. As micobactérias de crescimento lento com maior importância clínica desenvolvem-se bem entre 35°C a 37°C, com a excepção das seguintes: *M. conspicuum* (exige temperaturas entre 22°C a 30°C durante várias semanas e só cresce a 37°C em meios líquidos), *M. haemophilum* (prefere temperaturas entre os 28°C e os 30°C), *M. ulcerans* (desenvolve-se lentamente entre 25°C e 33°C), e algumas estirpes de *M. chelonae* (requerem temperaturas entre 28°C e os 33°C) (Griffith *et al.*, 2007).

As culturas para as micobactérias de crescimento rápido e *M. marinum* devem ser incubadas entre 28°C e 30°C. Todas as amostras provenientes da pele também devem ser incubadas entre 28°C e 30°C, enquanto as provenientes das articulações e ossos, devem ser incubadas entre 35°C e 37°C. Para a recuperação óptima de todas as espécies, deve realizar-se a duplicação das culturas, as quais deverão ser incubadas a diferentes temperaturas (Griffith *et al.*, 2007).

Em geral, a temperatura óptima de crescimento como característica para diferenciar as micobactérias, é útil para a separação de apenas um número muito limitado de espécies (Leslie & Glenn, 2006). A maioria das micobactérias não tuberculosas cresce dentro de 2 a 3 semanas em meio sólido. Para detectar *M. ulcerans* ou *M. genavense*, as culturas devem ser incubadas pelo menos 8 a 12 semanas. As micobactérias de crescimento rápido normalmente crescem dentro de 7 dias de incubação. A detecção precoce de micobactérias não tuberculosas pode ocorrer nos sistemas

de meios líquidos (Griffith *et al.*, 2007). Os meios de cultura líquidos apresentam um maior rendimento no crescimento das micobactérias e por isso produzem resultados mais rápidos do que os meios sólidos. Contudo, não permitem a observação da morfologia das colónias, taxas de crescimento, bem como o reconhecimento de infecções mistas (ou seja a detecção de mais do que uma espécie de micobactéria) e detecção de contaminantes (Griffith *et al.*, 2007). Um dos meios de cultura líquidos mais utilizados para o crescimento de micobactérias é “mycobacteria growth indicator tube” (MGIT) (Becton Dickinson, Sparks, E.U.A.), que contém meio Middlebrook 7H9 modificado, possuindo um sensor fluorescente sensível ao oxigénio (ruthenium). O crescimento das micobactérias é detectado através da emissão de fluorescência, à medida que o oxigénio no meio é consumido, sendo esta fluorescência detectada pelo equipamento associado (sistema BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, Sparks, EUA)) (Griffith *et al.*, 2007).

### **3.1.2 Características bioquímicas das micobactérias não tuberculosas com maior importância clínica**

Os testes bioquímicos têm sido usados desde meados do século passado para determinar as características fenotípicas de algumas espécies de micobactérias mais comuns (Jarzembowski & Young, 2008). Os testes bioquímicos mais representativos são a redução de nitrato, produção de catalase, inactivação da catalase a 68°C, hidrólise do Tween 80, redução do telurito de potássio, tolerância a 5% de NaCl, absorção de ferro, arilsulfatase e produção de urease (Jarzembowski & Young, 2008). Os principais testes bioquímicos utilizados para diferenciar e identificar as micobactérias não tuberculosas com maior importância clínica são apresentados na Tabela 4.



**Tabela 4. Testes bioquímicos mais utilizados para a identificação de micobactérias não tuberculosas com maior importância clínica (adaptado de Leão *et al.*, 2005).**

Espécie	Pigmentação	Produção niacina	Redução nitrato	Catalase semiquantitativa	Inativação da catalase a 68°C	Hidrólise Tween 80	Redução Telurito (3 dias)	Tolerância ao Sal	Captação de ferro	Ariisulfatase (3 dias)	Produção de Urease	Pirazinamidase	Isoniazida	Crescimento a 25°C	Crescimento a 45°C	Citrato	Crescimento em manitol	β-galactosidase
<i>M. abscessus</i>	N	ND	–	–/+	+	–/+	+	+	–	+	+	+	ND	+	–	–	–	–
<i>M. avium</i>	N	–	–	–	+/-	–	+	–	ND	–	–	+	+	+/-	–	ND	ND	–
<i>M. chelonae</i>	N	ND	–	+	+/-	–/+	+	–	–	+	+	+	ND	+	–	+	–	+
<i>M. fortuitum</i>	N	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
<i>M. goodii</i>	S	–	–	+	+	+	–	–	ND	–	–	+/-	–	+	–	ND	ND	–
<i>M. haemophilum</i> *	N	–	–	–	–	–	–	–	ND	–	–	+	+	+	–	ND	ND	–
<i>M. intracellulare</i>	N	–	–	–	+	–	+	–	ND	+/-	–	+	+/-	+	+/-	ND	ND	–
<i>M. kansasii</i>	P	–	+	+	+	+	–	–	ND	+	+	–	–	+	–	ND	ND	–
<i>M. malmoense</i>	N	–	–	–	–/+	+	+	–	ND	–	+/-	–/+	+	+	–	ND	ND	–
<i>M. marinum</i>	P	–	–	–/+	+/-	+	–	–	ND	+	+	+	+/-	+	–	ND	ND	–
<i>M. peregrinum</i>	N	ND	+	ND	ND	+	ND	–/+	+	+	ND	ND	ND	+	–	–	+	–
<i>M. scrofulaceum</i>	S	ND	–/+	+	ND	–	–	–	ND	–	+	–	+	+	–	ND	ND	–
<i>M. ulcerans</i>	N	–	–	–	+	–	–	–	ND	–	+/-	–	+	+/-	–	ND	ND	–
<i>M. xenopi</i>	N/P	–	–	–	+/-	–	–	–	ND	+	–	+/-	+/-	–	+	ND	ND	–

N não cromogêneas, P fotocromogêneas, S escotocromogêneas, - <15% de estirpes negativas, + > 85% de estirpes positivas, +/- 50 a 85% de estirpes positivas, –/+ 15 a 49% de estirpes positivas, ND não existem dados. \* necessita de hemina para o seu crescimento.

### 3.2 Métodos de identificação com base na análise de ácidos micólicos

Outros métodos de identificação de micobactérias baseiam-se na análise da composição dos ácidos micólicos. Os ácidos micólicos são ácidos gordos  $\beta$ -hidroxilos com uma cadeia longa lateral na posição  $\alpha$ , sendo o componente mais importante do teor lipídico da parede celular das micobactérias (Tortoli, 2003). Os ácidos micólicos diferem no número de átomos de carbono, variando entre 60 a 90, e na presença de diferentes grupos funcionais (Tortoli, 2003). Assim, a análise de ácidos micólicos pode ser uma ferramenta útil para a identificação de micobactérias (Tortoli, 2003). Para a análise de ácidos micólicos podem ser utilizados a cromatografia em camada fina (TLC, de “thin-layer chromatography”) e cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Um terceiro método também utilizado é a cromatografia gás-líquido (GLC, de “gas-liquid chromatography”), na qual os ácidos micólicos são analisados em termos dos produtos da sua hidrólise (Tortoli, 2003).

### 3.3 Métodos de identificação moleculares

Os atrasos no diagnóstico de infecções provocadas por micobactérias não tuberculosas, podem ter um impacto importante na escolha do tratamento mais adequado ao doente. Para evitar estes problemas, tornou-se necessário o desenvolvimento de métodos de identificação rápidos, fáceis de executar, com uma boa relação custo-eficácia e que acima de tudo sejam mais fiáveis, em alternativa aos métodos convencionais (tradicionais).

Nos últimos anos, foram desenvolvidos vários métodos alternativos e mais rápidos para a identificação de micobactérias, tais como os baseados em PCR-RFLP, hibridação de ácidos nucleicos, sequenciação de DNA e “microarrays” (Dvorska, 2001; da Silva *et al.*, 2001; Soini & Musser, 2001; Leão *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2005; Yam *et al.*, 2006; Neonakis *et al.*, 2008). Estes métodos têm cada vez mais importância, porque são mais rápidos e precisos que os métodos convencionais e na maioria dos casos, providenciam resultados mais fiáveis (Padilla *et al.*, 2004; Leite *et al.*, 2005). Adicionalmente, a manipulação de bactérias é mínima, ao contrário da

identificação através de testes bioquímicos (da Silva *et al.*, 2001), o que representa uma vantagem adicional em termos de segurança.

### 3.3.1 Técnicas baseadas em PCR-RFLP

Diversos autores propuseram testes baseados na técnica de PCR para a identificação de micobactérias a partir de amostras clínicas, com ou sem crescimento em cultura (da Silva *et al.*, 2001; Leão *et al.*, 2005). Diversos testes baseados na técnica de PCR têm sido utilizados para a detecção e identificação rápida de espécies de micobactérias (Kim *et al.*, 2001). Entre estes diferentes métodos destacam-se os que conjugam a amplificação de uma sequência específica por PCR com a sua diferenciação posterior por digestão com enzima(s) de restrição, e análise dos padrões de restrição obtidos num processo designado por PCR-RFLP (RFLP, do inglês “restriction fragment length polymorphism”); também descrito na literatura como PRA (do inglês “PCR-restriction enzyme analysis”). Estes métodos apresentam uma boa relação entre custo e eficiência (Hernandez *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001; da Silva *et al.*, 2001; Leão *et al.*, 2005).

Entre os genes ou sequências mais frequentemente utilizados como alvo para a identificação de micobactérias através da análise da restrição enzimática contam-se o gene que codifica para o 16S rRNA (gene *rrs*), a região espaçadora entre os genes que codificam para o 16S rRNA e para o 23S rRNA - zona ITS (de “Internal Transcribed Spacer”) - e o gene *hsp65* (Leite *et al.*, 2005, Katoch *et al.*, 2007). Outros genes também utilizados para identificação, embora com menor frequência incluem o gene que codifica para o 23S rRNA (gene *rrl*), e os genes *rpoB*, *dnaJ*, *gyrB*, *rpoV*, *oxyR*, *SecA1*, *hupB*, presentes em todas as micobactérias (Kim *et al.*, 2001; Leite *et al.*, 2005, Katoch *et al.*, 2007). Segundo Katoch *et al.* (2007), todos os ensaios de PCR-RFLP referidos anteriormente são rápidos e fáceis de executar, mas a sua capacidade para identificar com precisão as diferentes micobactérias varia com o ensaio utilizado. Em particular, o padrão de restrição obtido é tanto mais difícil de discriminar quanto menor for o tamanho dos produtos (Katoch *et al.*, 2007). O método de PCR-RFLP é preferível devido essencialmente à sua simplicidade e à sua relação

custo-eficácia (Katoch *et al.*, 2007), permitindo identificar uma grande variedade de espécies num único ensaio (Miller, Infante & Cleary 2000). Este tipo de metodologia só necessita de equipamento básico de biologia molecular, como um termociclador para realizar o PCR e um equipamento para a electroforese, sendo que os resultados podem ser obtidos dentro de algumas horas.

### **3.3.1.2 Gene do 16S rRNA**

A restrição enzimática dos produtos de PCR foi desenvolvida por Thierry *et al.* (1990) para a identificação de micobactérias, tendo como alvo o gene do 16S rRNA (gene *rrs*), que codifica para a subunidade menor do ribossoma (denominado 16S rDNA). Os produtos de amplificação apresentavam um tamanho de 1300 pb, sendo digeridos com as enzimas de restrição *RsaI* e *CfoI*. A enzima *RsaI* distingue as subespécies do complexo *M. avium*, enquanto *CfoI* permite a diferenciação das espécies *M. intracellulare*, *M. gordonae* e *M. ulcerans* (Dvorská *et al.*, 2001). Por outro lado, este método não consegue diferenciar facilmente as espécies do complexo *M. fortuitum*, serótipos de *M. kansasii* e *M. chelonae* (Dvorská *et al.*, 2001). O método de PCR-RFLP baseado no 16S rDNA apresenta limitações para a identificação de MNT, devido ao número bastante reduzido de locais polimórficos no género *Mycobacterium* (Roth *et al.*, 2000). Para esta baixa variabilidade contribui também o reduzido número de cópias de *rrs* por genoma –(uma a duas cópias, dependendo da espécie) (Turenne *et al.*, 2001).

### **3.3.1.1 Gene *hsp65***

O gene *hsp65*, que está presente em todas as micobactérias, é mais variável do que o gene do 16S rRNA, apresentando uma maior utilidade para a identificação de espécies geneticamente relacionadas (Ringuelet *et al.*, 1999; Häfner *et al.*, 2004). As variações na sequência do gene *hsp65* podem ser exploradas para a identificação ao nível da espécie tanto em micobactérias de crescimento lento como em espécies de crescimento rápido (Leão *et al.*, 1999; Ringuelet *et al.*, 1999).

A análise da restrição enzimática do gene *hsp65* foi inicialmente descrita por Telenti *et al.* (1993) para identificação de micobactérias. Este método consiste na amplificação de um fragmento de aproximadamente 440 pb do gene *hsp65*, que codifica para uma proteína de choque térmico de 65 kDa, seguido de digestão do produto amplificado com enzimas da restrição *BstEII* e *HaeIII*, e por fim pela análise do polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição, através electroforese em gel de agarose (Leão *et al.*, 1999; Barreto *et al.*, 2000; da Silva *et al.*, 2001; Neonakis *et al.*, 2008).

Telenti *et al.* em 1993, identificaram inicialmente 29 espécies de micobactérias. Este método foi posteriormente expandido, levando a um algoritmo que permite a identificação de 49 espécies e cinco subespécies/variantes (Devallois, Goh & Rastogi, 1997; Brunello *et al.*, 2001; Häfner *et al.*, 2004). Além disso, a existência de uma base de dados na Internet (PRAsite, <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>) que reúne 348 padrões de 113 espécies, veio facilitar o processo de identificação (Pourahmad *et al.*, 2009).

### **3.3.1.3 Região ITS**

Apesar das várias tentativas que foram feitas para diferenciar as diferentes espécies de micobactérias usando como alvos o 16S rDNA e o 23S rDNA, estes apresentaram um impacto limitado na diferenciação das espécies de micobactérias, devido à falta de variabilidade das suas sequências (Katoch *et al.*, 2007). Em contrapartida, a região que separa estes genes, designada por região ITS, de “Internal Transcribed Spacer”, foi considerada um alvo apropriado para diferenciar as espécies de micobactérias, já que a sua sequência é mais variável, mantendo-se no entanto relativamente conservada dentro da mesma espécie ou conjunto de espécies (Couto *et al.*, 2001; Katoch *et al.*, 2007).

Roth *et al.*, em 2000, apresentaram um novo estudo acerca da identificação de micobactérias através da amplificação da região ITS, seguida da sua restrição com diferentes enzimas. Os produtos resultantes da amplificação da região ITS correspondem a uma ou mais bandas, com

diferentes tamanhos (Roth *et al.*, 2000; Dvorská *et al.*, 2001). Em particular, verificou-se que a região ITS pode ser utilizada para diferenciar as espécies de micobactérias de crescimento lento das espécies de crescimento rápido, com base no tamanho do produto amplificado (Roth *et al.*, 2000; Deepa *et al.*, 2005).

As enzimas de restrição seleccionadas pelos mesmos autores, para a diferenciação dos produtos de amplificação foram a *HaeIII*, *CfoI*, *TaqI*, *MspI*, *DdeI*, *AvaII* e *HinfI* (Roth *et al.*, 2000).

Já em 2007, Katoch e colegas propõem um segundo método para a identificação de micobactérias, também baseado na região ITS (Katoch *et al.*, 2007). Este método baseia-se na amplificação e restrição dos produtos de restrição da região ITS, bem como parte das regiões dos genes do 16S e 23S rRNA que a flanqueiam, utilizando “primers” que demonstraram serem específicos para o género *Mycobacterium* (Katoch *et al.*, 2007). Este método diferencia-se assim do proposto por Roth *et al.* (2000), por englobar e amplificar para além da totalidade da região ITS, parte do 16S rDNA e do 23S rDNA, num total de cerca de 1800pb.

Os padrões de restrição foram obtidos através da restrição com as enzimas *HhaI*, *Hinf I* e *RsaI* (Katoch *et al.*, 2007). A análise dos padrões de restrição originados pela enzima *HhaI*, possibilitou a diferenciação e identificação das seguintes espécies de micobactérias não tuberculosas: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. flavescens*, *M. gordonae*, *M. terrae*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. smegmatis*. Segundo os autores a restrição com *HinfI* e *RsaI*, apenas não diferencia *M. avium* de *M. intracellulare*, já que foi obtido o mesmo padrão de restrição para ambas as espécies (Katoch *et al.*, 2007).

### **3.3.2 Hibridação de ácidos nucleicos**

#### **3.3.2.1 Sistema Accuprobe**

A utilização de sondas de DNA é um dos métodos moleculares mais bem sucedidos na identificação de micobactérias. Dentro destes, o sistema AccuProbe (Gen-Probe, San Diego, Calif, E.U.A), é utilizado pela maioria dos laboratórios clínicos de micobactérias em todo o mundo, sendo

considerado o “gold standard” para a identificação de micobactérias (Gitti *et al.*, 2006; Neonakis *et al.*, 2008). As sondas de DNA AccuProbe estão disponíveis para a identificação das espécies de micobactérias clinicamente importantes, incluindo o complexo *M. tuberculosis*, o complexo *M. avium* (e também *M. avium* e *M. intracellulare* separadamente), *M. kansasii* e *M. goodii* (Soini & Musser, 2001; Suffys *et al.*, 2001; Shrestha *et al.*, 2003; Lebrun *et al.*, 2005; Yam *et al.*, 2006; Neonakis *et al.*, 2008). Estes testes são baseados em sondas de DNA de cadeia simples marcadas com éster de acridina, que hibridam com zonas complementares do 16S rRNA libertado das bactérias, após a sua ruptura em sonicador (Leão *et al.*, 1999; Soini & Musser, 2001; Lee *et al.*, 2003; Lebrun *et al.*, 2005; Gitti *et al.*, 2006; Neonakis *et al.*, 2008). Segue-se a degradação da sonda que não hibridou, sendo posteriormente detectada a ocorrência de hibridação, através da emissão de luz num luminómetro (Leão *et al.*, 1999; Soini & Musser, 2001; Neonakis *et al.*, 2008). Após crescimento em cultura, o tempo até se obter um resultado através deste método, é de 2 horas (Soini & Musser, 2001; Neonakis *et al.*, 2008).

O sistema AccuProbe é considerado rápido, sensível e específico (Telenti *et al.*, 1993; Katoh *et al.*, 2007; Neonakis *et al.*, 2008), sendo também um método de fácil execução, necessitando apenas de um sonicador, banhos térmicos e um luminómetro. Este sistema pode ser combinado com o sistema BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson) ou outros sistemas de cultivo em meio líquido, diminuindo ainda mais o tempo necessário para a identificação das espécies. No entanto, o sistema Accuprobe apresenta algumas limitações, nomeadamente o seu custo, o facto de em cada ensaio apenas se poder testar uma sonda e a limitação de não estarem disponíveis sondas para todas as espécies de MNT patogénicas. Nestes casos, os isolados terão de ser identificados por outros métodos. Além disso, a sonda para o complexo *M. tuberculosis* não diferencia os seus membros (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum* e *M. microti*) (Soini & Musser, 2001).

### 3.3.2.2 Sistemas de hibridação reversa

A tecnologia de “DNA strips” (sondas em linha) é baseada na hibridação reversa dos produtos de PCR (amplificados com “primers” biotinilados) com sondas complementares, imobilizadas em linhas paralelas sobre uma membrana nitrocelulose, sendo a sua detecção colorimétrica (Padilla *et al.*, 2004; Gitti *et al.*, 2006). A cada espécie ou conjunto de espécies corresponde um padrão de bandas de hibridação específico. Este método permite a detecção e identificação simultânea de diferentes espécies de micobactérias num único ensaio (Miller *et al.*, 2000; Padilla *et al.*, 2004), não sendo portanto necessário realizar um ensaio diferente para cada espécie ou de aguardar pelo crescimento em meios sólidos para orientar a escolha da sonda de DNA (sistema Accuprobe) (Miller *et al.*, 2000). O tempo de resposta é de aproximadamente cinco horas (Neonakis *et al.*, 2008). Os dois sistemas de sondas em linha disponíveis comercialmente são o INNO LiPA Mycobacteria v2 e o GenoType® Mycobacterium. Ambos se baseiam na técnica de “DNA strip”, envolvendo a extracção de DNA a partir de material cultivado, uma amplificação e hibridação reversa (Luna *et al.*, 2006; Neonakis *et al.*, 2008)

#### 3.3.2.2.1 Inno LiPA Mycobacteria v2

O Inno LiPA Mycobacteria v2 (Innogenetics, Ghent, Belgica) é baseado na amplificação da região ITS para a identificação simultânea de 17 espécies de micobactérias mais frequentemente isoladas: complexo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, complexo *M. fortuitum*, *M. malmoense*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. haemophilum*, *M. marinum*/*M. ulcerans* e *M. celatum*. Além disso, tem a capacidade de discriminar subgrupos dentro de *M. kansasii* e *M. chelonae*. A ocorrência de culturas mistas é facilmente identificada (Miller *et al.*, 2000; Padilla *et al.*, 2004; Lebrun *et al.*, 2005; Neonakis *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009).



### 3.3.2.2 GenoType® Mycobacterium

No mercado estão disponíveis vários sistemas da linha GenoType® (Hain Lifescience, Nehren, Alemanha); o GenoType® MTBC (*Mycobacterium tuberculosis* complex) para distinguir as várias espécies do complexo *M. tuberculosis*, o GenoType® Mycobacterium CM (do inglês “Common Mycobacteria”) e o GenoType® Mycobacterium AS (do inglês “Additional Species”) para identificar outras espécies de micobactérias não identificadas ou diferenciadas pelo GenoType® Mycobacterium CM. O GenoType® Mycobacterium AS e CM usam como alvo a mesma região do 23S rDNA, assim o fragmento amplificado no GenoType® Mycobacterium CM pode ser utilizado para GenoType® Mycobacterium AS, não havendo a necessidade de realizar um segundo PCR (Russo *et al.*, 2006; Neonakis *et al.*, 2008). O GenoType® Mycobacterium CM permite a identificação do complexo *M. avium*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*-*M. ulcerans*, *M. peregrinum*, *M. xenopi* e o complexo *M. tuberculosis*. O GenoType® Mycobacterium AS permite a identificação de espécies adicionais de MNT, nomeadamente *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. cellatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. phlei*, *M. hemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum* e *M. shimoidei*.

### 3.3.3 Sequenciação de DNA

A sequenciação é considerada por muitos o “gold standard” para a identificação de micobactérias (Soini & Musser, 2001; Mijs *et al.*, 2002; Gitti *et al.*, 2006; Katoch *et al.*, 2007; Neonakis *et al.*, 2008). O método consiste na amplificação do DNA das micobactérias através do uso de “primers” específicos para o género. O organismo é identificado pela comparação das sequências de nucleótidos obtidas, com sequências de referência, presentes em várias bases de dados (Soini & Musser, 2001; Neonakis *et al.*, 2008). Geralmente é necessária apenas uma única sequenciação para uma identificação definitiva. Este método permite a detecção directa de espécies

de micobactérias, que não crescem em meios de cultura convencionais e também de diversas espécies não conhecidas (Soini & Musser, 2001). A sequenciação é no entanto um método dispendioso e necessita de técnicos e equipamento especializados, ou na ausência dos mesmos, de se recorrer a empresas especializadas.

O alvo utilizado mais frequentemente para a sequenciação é o gene do 16S rRNA. Estudos filogenéticos e taxonómicos das diferentes espécies de micobactérias foram durante muitos anos baseados na análise da sequência do gene do 16S rRNA (Adékambi. & Drancourt, 2004), sendo através da sua sequenciação, que novas espécies foram descritas e identificadas (Lee *et al.*, 2003; Ninet *et al.*, 1996; Katoch *et al.*, 2007). Este gene está presente em todas as espécies bacterianas e para além de conter regiões conservadas e variáveis, as mutações ocorrem a um ritmo lento e constante, o que o torna um alvo ideal para caracterização taxonómica (Ninet *et al.*, 1996; Soini & Musser, 2001). Assim como a molécula de 16S rRNA é muito conservada, e apresenta mudanças na sequência em determinadas posições, estas possuem significado filogenético, podendo ser específicas para os microrganismos ao nível da espécie (Dvorská *et al.*, 2001; Leão *et al.*, 2005). Segundo Leão *et al.* (2005) existem duas regiões hipervariáveis no gene do 16S rRNA das micobactérias: a região A (nucleótido 123 a 273) e a região B (nucleótido 430 a 500). As regiões hipervariáveis podem ser úteis para a identificação de micobactérias e para determinar relações filogenéticas entre espécies de micobactérias (Dvorská *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Yam *et al.*, 2006).

O número de genes que codifica para o 16S rRNA, varia consoante a espécie de micobactérias, sendo que foi demonstrado que as espécies de crescimento rápido possuem normalmente duas cópias, com a exceção *M. chelonae* e *M. abscessus*, enquanto as micobactérias de crescimento lento possuem apenas uma cópia do gene do 16S rRNA, com a exceção *M. terrae* (Ninet *et al.*, 1996; Reischl *et al.*, 1998). Apesar do número de cópias do gene do 16S rRNA poder variar consoante a espécie, as sequências são muito idênticas, podendo apresentar apenas pequenas variações (Ninet *et al.*, 1996; Reischl *et al.*, 1998)

Uma das desvantagens na utilização da sequenciação do gene do 16S rRNA para a identificação de micobactérias está relacionada com a existência de sequências 16S rRNA idênticas ou muito semelhantes, o que limita o uso deste alvo para a diferenciação e identificação de micobactérias (Mohamed *et al.*, 2005). Como por exemplo a identificação de espécies muito próximas, tais como o *M. kansasii* e o *M. gastri* que apresentam sequências idênticas do gene do 16S rRNA (Dvorská *et al.*, 2001).

A sequenciação do gene do 16S rRNA para a identificação de micobactérias apresenta algumas limitações, como o facto de existirem sequências idênticas ou muito semelhantes, não permitindo a diferenciação e identificação de algumas micobactérias (Mohamed *et al.*, 2005). Como por exemplo a identificação de espécies muito próximas, tais como o *M. kansasii* e o *M. gastri* que apresentam sequências idênticas do gene do 16S rRNA (Dvorská *et al.*, 2001).

A sequenciação da região ITS representa uma alternativa à sequenciação do gene 16S rRNA para a diferenciação de espécies estritamente relacionadas (Dvorská *et al.*, 2001; Leão *et al.*, 2005). Em comparação com a sequência 16S rRNA, a região ITS, revela-se mais eficaz para a identificação de isolados de micobactérias (Kuyper *et al.*, 2004), em particular, para diferenciar micobactérias de crescimento lento, que são idênticas ou muito próximas, com base nas suas sequências 16S rDNA (Roth *et al.*, 2000; Dvorská *et al.*, 2001; Neonakis *et al.*, 2008). Assim o elevado grau de variabilidade da região ITS permite a identificação de espécies muito próximas tais como o *M. kansasii* e *M. gastri*.

A sequenciação do 16S rDNA ou da região ITS não é suficientemente discriminatória para diferenciar algumas das espécies de micobactérias (Turenne *et al.*, 2006). Assim o gene *hsp65*, também conhecido por *groEL2*, que codifica para a proteína de choque térmico 65 kDa, tem sido muito útil no diagnóstico de micobactérias, tendo sido aplicado pela primeira vez por Hance e colegas em 1989, para a identificação de espécies de micobactérias através da sua detecção com sondas específicas (Mcnabb *et al.*, 2004; Turenne *et al.*, 2006). Devido à hipervariabilidade do gene *hsp65* a análise da sequência de Telenti tornou-se um método de rotina em estudos taxonómicos e

na identificação de isolados clínicos de micobactérias (Ringuet *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2001; McNabb *et al.*, 2004; Murcia *et al.*, 2006; Turenne *et al.*, 2006; Pourahmad *et al.*, 2009).

A sequenciação do gene *hsp65* é capaz de diferenciar entre a grande maioria das espécies de micobactérias, com exceção de algumas espécies, como os membros do complexo *M. tuberculosis* e subespécies do MAC (Turenne *et al.*, 2006).

A sequenciação do gene *recA* é também usada como alternativa à análise da sequência do gene do 16S rRNA para a diferenciação de micobactérias (Dvorská *et al.*, 2001). A proteína RecA, codificada por este gene está presente em todas as bactérias, devido à grande importância que apresenta na recombinação homóloga do DNA, na reparação do DNA e na indução da resposta SOS (Blackwood *et al.*, 2000; Dvorská *et al.*, 2001). Como parte da resposta SOS, a proteína RecA coordena a indução de mais de 20 genes envolvidos no processo de reparação do DNA, bem como a síntese e a recombinação de DNA e a divisão celular (Blackwood *et al.*, 2000). A amplificação do gene *recA* origina dois fragmentos (fragmento A e B), que através da sua sequenciação permitem diferenciar *M. kansasii* de *M. gastri* (fragmento A), e bem como *M. xenopi*, *M. asiaticum* e *M. shimoidei* (fragmento B) (Dvorská *et al.*, 2001).

A sequenciação do gene *rpoB* (que codifica para a sub-unidade beta da RNA polimerase das bactérias) permite a diferenciação entre as micobactérias, permitindo também a distinção entre as micobactérias de crescimento lento e de crescimento rápido (Kim *et al.*, 1999; Dvorská *et al.*, 2001; Adékambi, Colson & Drancourt, 2003). Assim o polimorfismo do gene *rpoB* é usado como alternativa para identificar e diferenciar micobactérias através da sua sequenciação (Dvorská *et al.*, 2001).

### 3.3.4 Microarrays

“High-density oligonucleotide arrays” (“microarrays” de DNA) também designados por DNA “chips”, oferecem a possibilidade de examinar rapidamente números elevados de sequências de DNA numa única etapa de hibridação (Gingeras *et al.*, 1998; Soini & Musser, 2001). Esta

técnica é baseada na hibridação de produtos amplificados (marcados fluorescentemente) com sondas de DNA fixadas de uma forma ordenada numa superfície. Os produtos amplificados que hibridaram, emitem um sinal fluorescente, que é detectado com um “scanner” (Soini & Musser, 2001). O padrão de hibridação é determinado através do varrimento por microscopia de fluorescência confocal (Neonakis *et al.*, 2008). O processo que inclui a etapa de hibridação e a leitura no “chip” requer aproximadamente duas horas (Neonakis *et al.*, 2008). A identificação de micobactérias através de “microarrays” já foi descrita na literatura para a região 16S rRNA e para o gene *rpoB* (Gingeras *et al.*, 1998; Soini & Musser, 2001). As sondas utilizadas são baseadas em 82 sequências únicas de 16S rRNA, as quais permitem a discriminação de 54 espécies de micobactérias (Soini & Musser, 2001). Este método também permite a detecção de mutações (Soini & Musser, 2001). Os resultados obtidos usando os microarrays demonstram a capacidade que este sistema apresenta para fornecer informações importantes sobre genes dos microrganismos (Leão *et al.*, 2005). Os resultados são obtidos rapidamente, são fiáveis e reprodutíveis. Uma das vantagens é a possibilidade de analisar culturas mistas e amostras contaminadas. O “microarray” é um método fácil de executar, pode ser facilmente automatizado e permite a identificação de um grande número de espécies numa única reacção (Soini & Musser, 2001). A grande desvantagem deste método é o elevado custo do equipamento (Neonakis *et al.*, 2008).

## **II. Objectivos**

Nesta Dissertação foram comparados três métodos moleculares “in-house”, baseados no PCR-RFLP de diferentes regiões ou genes, para a identificação de micobactérias não tuberculosas isoladas no laboratório de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT, UNL), tendo como base a identificação previamente obtida com o sistema comercial GenoType® Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience GmbH).

Pretendeu-se assim testar e eventualmente validar outras alternativas para a identificação destas micobactérias, cuja importância no laboratório de micobacteriologia é cada vez maior, na tentativa de seleccionar métodos de identificação mais rápidos, fiáveis e com uma boa relação custo-eficiência.

### III - MATERIAL E MÉTODOS

#### 1. Materiais

##### 1.1 Material biológico

Neste estudo foram analisados 47 isolados clínicos de micobactérias não tuberculosas, seleccionados de acordo com as espécies mais frequentemente identificadas no laboratório de Micobactérias do IHMT, utilizando o sistema GenoType® CM/AS (Hain Lifescience GmbH). Foram ainda utilizadas três estirpes de referência, duas de micobactérias não tuberculosas e uma de *Mycobacterium tuberculosis*.

##### 1.1.1 Estirpes de referência

As estirpes de referência seleccionadas para este estudo correspondem às estirpes tipo de *Mycobacterium avium* e de *Mycobacterium intracellulare* e ainda à estirpe de referência de *Mycobacterium tuberculosis* mais frequentemente utilizada em laboratório (Tabela 5).

**Tabela 5. Estirpes de referências utilizadas.**

<b>Espécie</b>	<b>Estirpe</b>
<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC 25291 <sup>T</sup>
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	ATCC 13950 <sup>T</sup>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	ATCC 27294

##### 1.1.2 Estirpes clínicas

Os isolados clínicos estudados, como já foi referido anteriormente, são provenientes da colecção de culturas do laboratório de Micobactérias do IHMT e correspondem às espécies mais frequentemente isoladas entre 2005 e 2008. Estes isolados foram previamente identificados através dos sistemas de identificação GenoType® Mycobacterium CM e AS (Hain Lifescience GmbH, Alemanha) (Couto *et al.*, 2010) (Tabela 6).

**Tabela 6. Isolados clínicos estudados.**

Identificação prévia <sup>a</sup>	Nº do Isolado	Ano
<i>M. abscessus</i>	118/08	2008
<i>M. abscessus</i>	188/08	2008
<i>M. avium</i>	176/08	2008
<i>M. avium</i>	68/06	2006
<i>M. avium</i>	78/06	2006
<i>M. avium</i>	92/06	2006
<i>M. avium</i>	229/06	2006
<i>M. avium</i>	8/05	2005
<i>M. avium</i>	189/05	2005
<i>M. avium</i>	291/05	2005
<i>M. chelonae</i>	107/08	2008
<i>M. chelonae</i>	306/08	2008
<i>M. chelonae</i>	291/07	2007
<i>M. fortuitum</i>	120/08	2008
<i>M. fortuitum</i>	148/08	2008
<i>M. fortuitum</i>	441/07	2007
<i>M. fortuitum</i>	496/07	2007
<i>M. fortuitum</i>	337/06	2006
<i>M. fortuitum</i>	9/06	2006
<i>M. gordonae</i>	205/08	2008
<i>M. gordonae</i>	284/08	2008
<i>M. gordonae</i>	349/08	2008
<i>M. gordonae</i>	126/07	2007
<i>M. gordonae</i>	141/07	2007
<i>M. gordonae</i>	151/07	2007
<i>M. gordonae</i>	463/07	2007
<i>M. gordonae</i>	171/07	2007
<i>M. gordonae</i>	235/07	2007
<i>M. gordonae</i>	194/07	2007
<i>M. intracellulare</i>	30/08	2008
<i>M. intracellulare</i>	92/08	2008
<i>M. intracellulare</i>	154/08	2008
<i>M. intracellulare</i>	164/08	2008

<sup>a</sup> Utilizando o sistema GenoType® Mycobacterium CM/AS (Couto *et al.*, 2010)



**Tabela 6.** (continuação)

Identificação prévia <sup>a</sup>	Nº do Isolado	Ano
<i>M. intracellulare</i>	170/08	2008
<i>M. kansasii</i>	302/08	2008
<i>M. kansasii</i>	8/07	2007
<i>M. kansasii</i>	27/07	2007
<i>M. kansasii</i>	128/07	2007
<i>M. kansasii</i>	245/07	2007
<i>M. peregrinum</i>	60/08	2008
<i>M. peregrinum</i>	462/07	2007
<i>M. scrofulaceum</i>	177/08	2008
<i>M. szulgai</i>	344/08	2008
<i>M. xenopi</i>	42/08	2008
<i>M. xenopi</i>	102/08	2008
<i>M. xenopi</i>	159/08	2008
<i>M. xenopi</i>	197/08	2008

<sup>a</sup> Utilizando o sistema GenoType® Mycobacterium CM/AS (Couto *et al.*, 2010).

### 1.1.3 Outro material biológico

#### 1.1.3.1 Marcadores de peso molecular

Foram usados os marcadores de peso molecular 100 bp DNA Ladder, 50 bp DNA Ladder e 1Kb DNA Ladder (Fermentas International Inc., Ontário, Canadá). Estes marcadores permitiram a análise e o cálculo do tamanho, em pares de bases (pb) dos produtos de amplificação e restrição.

#### 1.1.3.2 “Primers”

Os “primers” utilizados para a execução dos três métodos de identificação em análise estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7. Sequências dos “primers” utilizados neste trabalho.**

“Primer”	Sequência nucleotídica (5’-3’)	Alvo	Amplificação (pb)	Referências
Sp1	ACCTCCTTTCTAAGGAGCACC	Região ITS	200 - 330	Roth <i>et al.</i> , 2000
Sp2	GATGCTCGCAACCACTATCCA			
Katoch_Fw	GATTGACGGTAGGTGGAGAAGAAG	Região ITS e regiões adjacentes (partes de 16S e 23S rDNA)	1800	Katoch <i>et al.</i> , 2007
Katoch_Rv	CACGGGCCCCGCTGCTACTCG			
Tb11	ACCAACGATGGTGTGTCCAT	Gene <i>hsp65</i>	439	Telenti <i>et al.</i> , 1993
Tb12	CTTGTCGAACCGCATACCCT			

Os “primers” seleccionados para a amplificação da região ITS são o Sp1, que possui a sequência AAGGA correspondente ao início da região ITS e o Sp2, que corresponde à zona 190-210 nt da sequência ITS de *M. tuberculosis* (número de acesso EMBL: L15623) (Roth *et al.*, 2000). Os produtos de amplificação podem variar entre os 200 pb e os 330 pb, conforme a espécie de micobactéria testada (Roth *et al.*, 2000).

Os “primers” adoptados para a amplificação da região ITS e parte das regiões de 16S e 23S rDNA adjacentes foram descritos por Katoch *et al.* (2007). O “primer forward” foi desenhado a partir da posição 468 do 16S rDNA de *M. tuberculosis* e o “primer reverse” corresponde aos nucleótidos 477 a 457 do 23S rDNA de *M. tuberculosis* (Indian Patent Application Number: 2418/DEL/2006) (Katoch *et al.*, 2007). Os produtos de amplificação apresentam cerca de 1800 pb.

Os “primers” seleccionados para a amplificação do gene *hsp65*, Tb11 e Tb12, foram descritos por Telenti *et al.* (1993) e permitem a amplificação de um fragmento de cerca de 440 pb (Telenti *et al.*, 1993; Pourahmad *et al.*, 2009).

## 1.2 Soluções, géis e enzimas

A composição e o modo de preparação das soluções utilizadas neste estudo encontram-se descritos na Tabela 8 e 9.

**Tabela 8. Composição das soluções tampão utilizadas.**

Solução	Composição
TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA)	Solução “stock” a 50X : 40 mM Tris-acetato; 1mM EDTA, pH 8,0
TE 1X	10 mM Tris pH8,0; 1mM EDTA, pH 8,0

**Tabela 9. Composição das soluções utilizadas para electroforese.**

Solução	Composição
Brometo de etídeo (EtBr)	10 mg/ml em água bidestilada estéril Mantido ao abrigo da luz
Solução de deposição (Loading Dye) <sup>a</sup>	10mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% de azul bromofenol, 0,03% Xileno cianol FF, 60% glicerol e 60mM EDTA.

<sup>a</sup> Fermentas

### **Preparação dos géis de agarose e agarose Metaphor®**

O modo de preparação do gel de agarose (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) consiste em pesar 2 ou 3 g de agarose (dependendo da percentagem final pretendida) e dissolver em 100 mL de TAE 1X no microondas. Após a agarose estar completamente dissolvida, deixa-se arrefecer à temperatura ambiente entre os 50-60°C e adiciona-se brometo de etídio para se obter uma concentração final de 0,25 µg/mL e homogeneíza-se. A solução é depois colocada no suporte adequado com o pente, onde fica a polimerizar à temperatura ambiente. Depois da polimerização do gel, este é colocado na tina de electroforese na presença de tampão TAE 1X e retira-se o pente.

A preparação do gel Metaphor® (Cambrex corporation, East Rutherford, New Jersey, EUA) é um pouco mais complexa, envolvendo a agitação da agarose em tampão TAE 1X previamente refrigerado durante 20 minutos, seguindo-se a sua dissolução no microondas. Após a agarose estar completamente dissolvida, deixa-se arrefecer à temperatura ambiente entre os 50-60°C, adiciona-se brometo de etídio para se obter uma concentração final de 0,25 µg/mL e homogeneíza-se. A suspensão é depois colocada no suporte adequado com o pente, onde fica a

polimerizar à temperatura ambiente. Depois de polimerizado, o gel deve ser refrigerado a 4°C pelo menos 30 minutos, bem como o tampão TAE 1X a utilizar na electroforese.

Todos os resíduos sólidos contaminados com EtBr são eliminados por incineração.

As características das enzimas de restrição utilizadas encontram-se descritas na Tabela 10.

**Tabela 10. Características das enzimas de restrição utilizadas.**

Enzimas de restrição	Fabricante	Isoesquisómero (referido na literatura)	Concentração	Temperatura <sup>a</sup>	Tampão <sup>b</sup>
<i>Bsu</i> RI	Fermentas	<i>Hae</i> III	10 U/μl	37°C	R
<i>Hha</i> I	Fermentas	<i>Cfo</i> I	10 U/μl	37°C	Tango
<i>Taq</i> I	Fermentas		10 U/μl	65°C	<i>Taq</i> I
<i>Eco</i> 91I	Fermentas	<i>Bst</i> EII	10 U/μl	37°C	O

<sup>a</sup> Temperatura óptima de actuação

<sup>b</sup> Fermentas

## 2. Métodos

O estudo realizado compreende a análise de três protocolos de identificação de micobactérias não tuberculosas. Os três protocolos utilizam o mesmo tipo de técnicas, nomeadamente extracção de DNA genómico dos isolados seleccionados, amplificação de fragmentos específicos por PCR, purificação dos fragmentos amplificados (realizada apenas em alguns protocolos), restrição dos produtos amplificados com diferentes enzimas de restrição e finalmente, análise dos produtos de restrição em gel de agarose.

### 2.1 Extracção de DNA genómico

O procedimento de extracção de DNA genómico é de grande importância para a realização de métodos moleculares de diagnóstico baseados em PCR. O método de extracção deverá permitir a obtenção de DNA genómico puro e em quantidade adequada para a sua posterior análise.

Neste estudo foram utilizadas amostras de DNA previamente extraídas com o QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, EUA), a partir de culturas das estirpes de referência e das estirpes clínicas existentes no laboratório de Micobactérias do IHMT. O protocolo de extração do DNA genómico foi realizado de acordo com as normas do fabricante. Concisamente, o método consiste em extrair o DNA genómico a partir das células dos diferentes isolados de micobactérias após o seu crescimento em meio de cultura líquido ou sólido. Para tal, prepara-se uma suspensão de células, que é centrifugada durante 10 minutos a 13000 rpm (Biofuge pico Heraeus, DJB Labcare Ltd, Reino Unido). Posteriormente ressuspende-se o sedimento em 1000 µL de tampão TE, seguindo-se homogeneização no vortex e nova centrifugação a 13000 rpm durante 10 minutos. O sedimento é ressuspendido em 200 µL de TE, ficando a incubar durante 20 minutos a 95°C. Após a incubação, a suspensão é arrefecida à temperatura ambiente, adicionando-se 20 µL de proteinase K (Qiagen) a 20mg/mL e 200 µL de tampão AL (Qiagen), seguindo-se incubação a 56°C durante 10 minutos. De seguida, adicionam-se 200 µL de etanol (96-100%) (Riedel de Haen, Alemenha) e a solução é homogeneizada, sendo então transferida para a coluna QIAamp, seguindo-se a lavagem com os tampões AW1 e AW2 (Qiagen). O DNA é posteriormente eluído, através da adição de 200 µL de tampão AE (Qiagen), incubação à temperatura ambiente por 5 minutos, seguida de centrifugação a 8000 rpm durante 1 minuto e recolha do DNA genómico.

## **2.2 Reacção em cadeia da Polimerase**

A reacção de polimerase em cadeia (PCR, de “polymerase chain reaction”) é a técnica que permite a amplificação *in vitro* do DNA, num processo extremamente rápido. A técnica de PCR está de acordo com o princípio natural de replicação de DNA, sendo basicamente uma reacção enzimática catalisada por uma polimerase de DNA termoestável (*Taq* polimerase), que ocorre em 3 etapas e que em conjunto formam um ciclo, o qual se repete um número específico de vezes. Assim, o ciclo de PCR engloba a desnaturação, o emparelhamento e a extensão. A desnaturação consiste na separação da dupla cadeia do DNA em duas cadeias simples através do aumento da temperatura

(geralmente superior a 90°C). O emparelhamento baseia-se na ligação dos iniciadores ou “primers” à sequência alvo do DNA (hibridam com a sequência complementar) a ser amplificada. A extensão consiste na polimerização propriamente dita, baseando-se na incorporação dos nucleótidos complementares à sequência alvo, utilizando os dNTPs em solução, pela *Taq* polimerase.

Neste estudo realizaram-se três protocolos de PCR, os quais amplificaram regiões ou genes distintos nomeadamente: (i) a região ITS, (ii) a região ITS e as regiões adjacentes (extremidades dos genes que codificam para o 16S rRNA e para o 23S rRNA) e por último, (iii) o gene que codifica para a proteína de choque térmico 65 KDa (gene *hsp65*).

As misturas de reacção foram preparadas num local separado, onde não ocorre manipulação de DNA, para se evitar possíveis contaminações. No final da preparação, a mistura de reacção é dividida pelos tubos de PCR. O DNA dos isolados é posteriormente adicionado ao tubo respectivo, tendo sempre em conta, que existe um tubo que vai funcionar como controlo negativo da reacção, ou seja sem DNA. As reacções de PCR foram realizadas no termociclador “Mastercycler Personal Eppendorf®” (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), segundo as condições específicas descritas para cada método (ver pontos 2.5.1, 2.6.1 e 2.7.1).

## **2.3 Purificação dos produtos amplificados**

A purificação dos produtos amplificados através da técnica de PCR, permite remover dímeros de “primers” e outros produtos da reacção de amplificação que possam interferir nos passos seguintes da análise dos produtos de amplificação, nomeadamente na digestão enzimática.

Assim, quando necessário, os produtos de amplificação foram purificados através do sistema Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, EUA). Esta purificação foi realizada segundo as instruções do fabricante, com uma pequena alteração que consistiu em pré-aquecer a resina a 37°C durante 30 minutos. No tubo de microcentrífuga foram colocados 100 µL de tampão de purificação e adicionado o produto amplificado, seguindo-se a sua homogeneização. A resina de purificação é posteriormente adicionada a esta solução, seguindo-se uma incubação à temperatura

ambiente durante um minuto, durante o qual a suspensão é agitada diversas vezes. Esta suspensão é posteriormente colocada numa seringa e passada através da microcoluna Wizard, por impulsão do êmbolo da seringa. Sucede-se a lavagem da coluna com 2 mL de isopropanol a 80%. A microcoluna é depois colocada num novo tubo de microcentrifuga, procedendo-se à sua centrifugação a 13000 rpm durante 2 minutos. O DNA foi eluído por adição de 50 µL de água bidestilada estéril, previamente aquecida a 65°C, à microcoluna, e incubação à temperatura ambiente durante 2 minutos. A recolha do DNA purificado realiza-se através de uma centrifugação a 13000 rpm durante 20 segundos. Os produtos purificados são posteriormente armazenados a 4°C.

## **2.4 Digestão enzimática**

A restrição dos produtos amplificados através de enzimas de restrição é aplicada para tentar diferenciar os produtos de amplificação obtidos e assim identificar os isolados clínicos de micobactérias. Os padrões de restrição formados podem ser característicos e específicos de uma determinada espécie ou até mesmo de uma subespécie, permitindo a sua identificação e diferenciação.

A técnica de RFLP (de “restriction fragment length polymorfism”) baseia-se na hidrólise do DNA com enzimas de restrição e posterior análise dos produtos de restrição, através de electroforese em gel de agarose. O termo a ser utilizado nesta Dissertação, PCR-RFLP, refere-se à diferenciação dos produtos de amplificação de diferentes alvos genéticos, por restrição com diversas enzimas e análise dos produtos resultantes por electroforese em gel de agarose.

As enzimas de restrição e as condições específicas utilizadas em cada método, bem como as condições de análise dos produtos de restrição, após electroforese em gel de agarose, utilizando o equipamento Gel Doc XR (Bio-Rad, Milão, Itália), com o “software” Quantity One 4.6.3 (Bio-Rad, Milão, Itália), estão descritos nos pontos 2.5.2, 2.6.2 e 2.7.2.

## **2.5 Condições específicas do método de identificação baseado na região ITS**

### **2.5.1 Condições de PCR**

A amplificação da região ITS de micobactérias é realizada numa mistura de reacção constituída por 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1% de Triton X-100, 200 µM da mistura de cada nucleótido (dNTP), 20 pmol de cada “primer” (Sp1 e Sp2), 1 U de *Taq* DNA Polymerase (Fermentas), 5 µL de DNA do isolado e água bidestilada estéril, para um volume de 50 µL.

A reacção de PCR processa-se nas condições de amplificação que consistem na desnaturação inicial a 95°C durante 4 minutos, seguindo-se 37 ciclos constituídos por desnaturação a 95°C durante 1 minuto, emparelhamento dos “primers” a 59°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto, seguindo-se um passo final de extensão a 72°C durante 10 minutos.

Após a reacção de PCR, os produtos de amplificação são armazenados a 4°C, até se verificar a eficácia da reacção de amplificação.

O resultado da reacção de amplificação é verificado através da electroforese dos produtos resultantes em gel de 3% de agarose, com tampão TAE 1X, a 65 V durante duas horas e visualizado através do equipamento Gel Doc XR e o “software” Quantity One 4.6.3. Para deposição das amostras no gel de agarose, adicionaram-se 2 µL de solução de deposição a 5 µL de produto de amplificação. Para determinar o tamanho dos produtos de amplificação foi utilizado o marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder. No cálculo dos tamanhos dos fragmentos de amplificação, estes foram arredondados ao múltiplo de 5 pb mais próximo.

### **2.5.2 Condições de restrição**

A digestão dos produtos amplificação da região ITS é baseada no método de Roth *et al.* (2000), tendo neste estudo sido utilizadas apenas três enzimas de restrição; *Hae*III, *Cfo*I e *Taq*I.



Devido a várias dificuldades verificadas na restrição dos produtos de amplificação da região ITS, neste trabalho utilizaram-se produtos de amplificação com e sem o passo de purificação com o sistema Wizard.

Para os produtos de amplificação purificados, a mistura da reacção de restrição é constituída por 5 µL do DNA purificado, 2 µL de tampão da enzima, 12 µL de água bidestilada estéril e 1 µL de enzima (10 U).

Para os produtos de amplificação para os quais não foi realizada purificação, a mistura da reacção de restrição é composta por 10 µL do DNA amplificado, 2,5 µL de tampão da enzima, 12 µL de água bidestilada estéril e 0,5 µL de enzima (5 U).

A reacção de restrição é incubada em banho de água durante duas horas à temperatura recomendada pelo fabricante da enzima, 37°C para as enzimas *HaeIII* e *CfoI* e 65°C para a enzima *TaqI*.

Após a realização das restrições, os fragmentos resultantes são analisados em gel de agarose Metaphor® a 3,5%, utilizando o marcador 100 bp DNA Ladder. A electroforese ocorre na presença de tampão TAE 1X arrefecido a 4°C, durante 2 horas a 65 V. Os tamanhos dos fragmentos de restrição são calculados, considerando um arredondamento ao múltiplo de 5 pb mais próximo e os padrões obtidos são analisados com base no algoritmo de Roth *et al.* (2000).

## **2.6 Condições específicas do método de identificação baseado no ITS e regiões adjacentes**

### **2.6.1 Condições de PCR**

A amplificação da região ITS e parte das regiões 16S e 23S rDNA adjacentes envolve a preparação de uma mistura de reacção composta por 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1% de Triton X-100, 200 µM da mistura de cada nucleótido (dNTP), 0,6 pmol de cada “primer”, 2,5 U de *Taq* DNA Polymerase, 5 µL de DNA do isolado e água bidestilada estéril, num volume total de 50 µL.

A reacção de PCR processa-se nas seguintes condições de amplificação: uma desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, seguindo-se 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, emparelhamento dos “primers” a 59°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 2 minutos. Segue-se um passo final de extensão a 72°C durante 10 minutos.

Os produtos do PCR do ITS e regiões adjacentes foram depois analisados através de electroforese em gel de 1% de agarose com tampão TAE 1X, utilizando o marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder. A electroforese decorreu a 65 V durante uma hora e vinte minutos. O tamanho dos fragmentos de amplificação foi calculado com aproximação a 100 pb.

### **2.6.2 Condições de restrição**

A restrição dos produtos amplificados é baseada no método de Katoch *et al.* (2007), mas envolvendo apenas uma enzima, a *HhaI*. A mistura da reacção de restrição consiste em 15 µL do DNA purificado, 3 µL de tampão da enzima, 11 µL de água bidestilada estéril e 1 µL de enzima (10 U). A reacção de restrição é incubada em banho de água à temperatura recomendada pelo fabricante da enzima, 37°C, durante 2 horas.

Os produtos de restrição foram analisados em gel de 2% de agarose, utilizando o marcador 100 pb DNA Ladder. A electroforese ocorre na presença de Tampão TAE 1X, durante 2 horas a 65 V. Os tamanhos dos fragmentos de restrição são calculados, considerando um arredondamento ao múltiplo de 5 pb mais próximo e comparados com os obtidos por Katoch *et al.* (2007).

## **2.7 Condições específicas do método de identificação baseado no gene *hsp65***

### **2.7.1 Condições de PCR**

A amplificação de parte do gene *hsp65* requer uma mistura de reacção constituída por 10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10% de glicerol, 200 µM da mistura de cada nucleótido (dNTP), 0,5 pmol de cada “primer” (Tb11 e Tb12), 1,25U de *Taq* DNA Polymerase, 5

μL de DNA do isolado e o restante do volume de água bidestilada estéril, para um volume total de 50 μL.

A reacção de PCR processa-se nas seguintes condições de amplificação: uma desnaturação inicial a 94°C durante 4 minutos, seguindo-se 38 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, emparelhamento dos “primers” a 60°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto. Segue-se um período de extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Após a reacção de PCR os produtos de amplificação são armazenados a 4°C, até à sua visualização em gel de 3% de agarose, com tampão TAE 1X, a 65 V durante duas horas. Para determinar o tamanho dos produtos de amplificação foi utilizado o marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder. No cálculo dos tamanhos dos fragmentos de amplificação, estes foram arredondados ao múltiplo de 5 pb mais próximo.

### **2.7.2 Condições de restrição**

A restrição dos produtos de amplificados é baseada no método de Telenti *et al.* (1993), e envolve duas enzimas de restrição, a *Bst*EII e a *Hae*III.

A mistura da reacção de restrição consiste em 10 μL de produto amplificado, 2,5 μL de tampão da enzima, 12 μL de água bidestilada estéril e 0,5 μL de enzima (5 U). A reacção de restrição é incubada em banho de água a 37°C, durante 2 horas.

Após a realização das restrições, os fragmentos resultantes são analisados em gel de agarose Metaphor® a 3,5%, utilizando o marcador 50 bp DNA Ladder. A electroforese ocorre na presença de tampão TAE 1X arrefecido a 4°C, durante 2 horas a 65 V. Os tamanhos dos fragmentos de restrição são calculados, considerando um arredondamento ao múltiplo de 5 pb mais próximo e analisados com base no algoritmo de Telenti *et al.* (1993), Devallois *et al.* (1997), Brunello *et al.* (2001) e ainda através da base de dados disponível na internet (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

## IV – RESULTADOS

Os métodos moleculares “in house” testados neste estudo apresentam como finalidade a identificação de micobactérias não tuberculosas a partir de isolados clínicos.

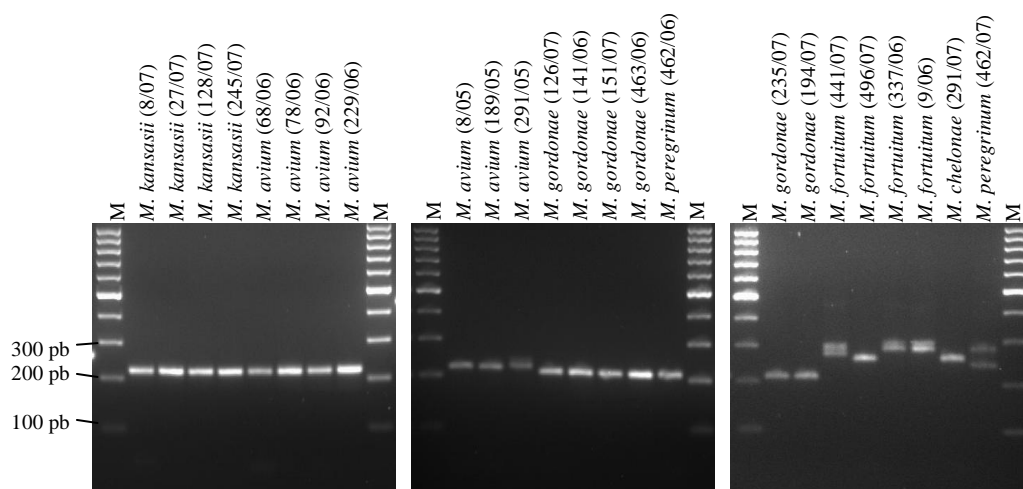
De modo a testar a capacidade de identificação dos métodos envolvidos, foram utilizados 50 isolados (47 isolados clínicos pertencentes à colecção de culturas do laboratório de Micobactérias do IHMT e três estirpes de referência compreendendo duas espécies não tuberculosas e *M. tuberculosis*).

A estirpe de referência de *M. tuberculosis* foi utilizada com o objectivo de testar a capacidade dos vários métodos para diferenciar as micobactérias não tuberculosas de *M. tuberculosis*.

Os passos de cultura e de extracção de DNA dos diferentes isolados foram realizados numa fase anterior a este estudo, pelo que essas etapas não serão aqui abordadas.

### 1. PCR RFLP da região ITS

As reacções de PCR foram realizadas com os “primers” Sp1 e Sp2, de modo a amplificar um fragmento interno à região ITS, presente em todas as micobactérias. Os produtos resultantes da técnica de PCR foram analisados após electroforese em gel de agarose (Figura 2).

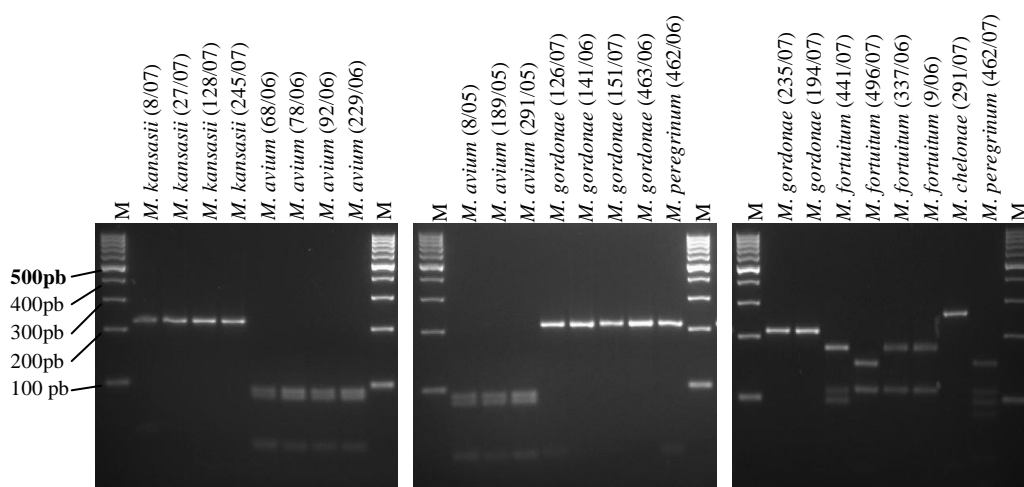


**Figura 2.** Electroforese em gel de agarose (3%) dos produtos de amplificação da região ITS. M: marcador molecular Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder.

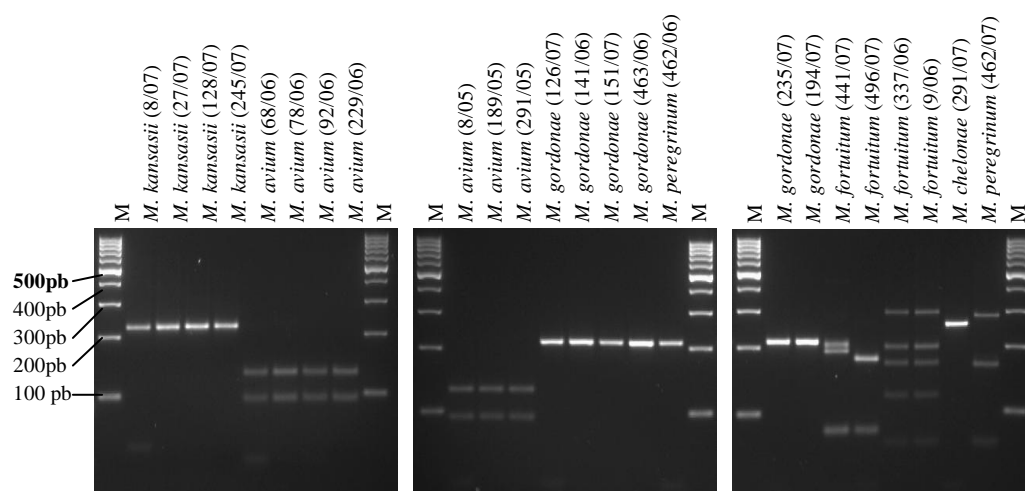
Todos os isolados testados apresentaram amplificação com os “primers” utilizados, tendo sido obtidos um a dois fragmentos de amplificação por isolado, dependendo da sua espécie (Tabela 11). Os produtos de amplificação da região ITS variaram entre os 205 pb (*M. xenopi* - isolado 102/08) e os 300 pb (*M. fortuitum* - isolados 9/06 e 337/06).

As micobactérias não tuberculosas de crescimento rápido apresentaram fragmentos resultantes da amplificação da região ITS superiores a 240 pb, enquanto as micobactérias de crescimento lento apresentaram fragmentos mais pequenos, permitindo uma diferenciação inicial entre estes dois grupos de micobactérias. A única excepção a esta observação geral foi a do isolado 177/08, previamente identificado pelo sistema GenoType® Mycobacterium CM como *M. scrofulaceum* e para o qual, com o ITS-PCR, foram visualizados dois fragmentos de amplificação, um de 290 pb e outro de 215 pb.

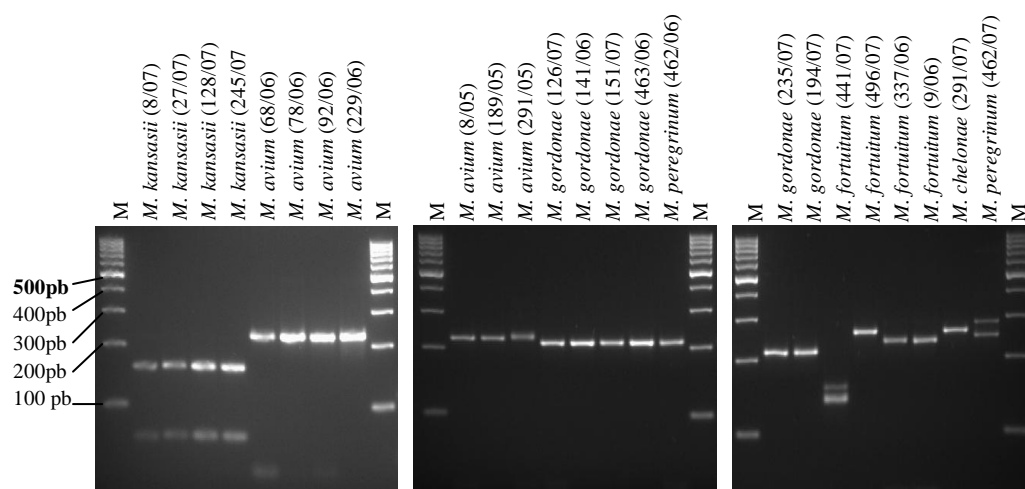
De qualquer modo, a análise dos produtos de amplificação não permite identificar os isolados, já que esta análise não é suficientemente discriminatória. Assim, na tentativa de identificar os diferentes isolados, realizou-se a restrição dos produtos previamente amplificados com as enzimas de restrição *HaeIII*, *CfoI* e *TaqI*. Os produtos resultantes das diversas restrições foram separados por electroforese em gel de agarose Metaphor® (Figuras 3 a 5).



**Figura 3.** Electroforese em gel de agarose Metaphor® (3,5%) dos produtos resultantes da restrição dos produtos de amplificação da região ITS com a enzima de restrição *HaeIII*. M: marcador molecular Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder.



**Figura 4.** Electroforese em gel de agarose Metaphor® (3,5%) dos produtos resultantes da restrição dos produtos de amplificação da região ITS com a enzima de restrição *CfoI*. M: marcador molecular Gene Ruler™ 100 DNA Ladder.



**Figura 5.** Electroforese em gel de agarose Metaphor® (3,5%) dos produtos resultantes da restrição dos produtos de amplificação da região ITS com a enzima de restrição *TaqI*. M: marcador molecular Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder.

Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 11, onde são descritos os produtos de amplificação da região ITS, bem como os fragmentos obtidos após a sua restrição com as enzimas de restrição *HaeIII*, *CfoI* e *TaqI*.

**Tabela 11. Identificação de micobactérias por PCR- RFLP de ITS, através da análise dos fragmentos obtidos após amplificação e restrição dos produtos amplificados com diferentes enzimas.**

Isolado	Identificação prévia <sup>(a)</sup>	Produtos de amplificação (pb)	Produtos de Restrição (pb)			Identificação PCR-RFLP de ITS
			<i>HaeIII</i>	<i>CfoI</i>	<i>TaqI</i>	
118/08	<i>M. abscessus</i>	260	260	260	230, (30*)	<i>M. abscessus</i>
188/08	<i>M. abscessus</i>	260	260	260	225, 35	<i>M. abscessus</i>
176/08	<i>M. avium</i>	225	90, 85, 45	130, 95	220	<i>M. avium/</i> <i>M. bohemicum</i>
68/06	<i>M. avium</i>	225	90, 85, 45	130, 95	220	<i>M. avium/</i> <i>M. bohemicum</i>
78/06	<i>M. avium</i>	225	90, 85, 45	130, 95	220	<i>M. avium/</i> <i>M. bohemicum</i>
92/06	<i>M. avium</i>	225	90, 85, 45	130, 95	220	<i>M. avium/</i> <i>M. bohemicum</i>
229/06	<i>M. avium</i>	225	90, 85, 45	130, 95	220	<i>M. avium/</i> <i>M. bohemicum</i>
8/05	<i>M. avium</i>	225	90, 85, 45	130, 95	220	<i>M. avium/</i> <i>M. bohemicum</i>
189/05	<i>M. avium</i>	225	90, 85, 45	130, 95	220	<i>M. avium/</i> <i>M. bohemicum</i>
291/05	<i>M. avium</i>	225	90, 85, 45	130, 95	225	<i>M. avium/</i> <i>M. bohemicum</i>
ATCC 25291 <sup>T</sup>	<i>M. avium</i>	225	90, 85, 45	130, 95	225	<i>M. avium/</i> <i>M. bohemicum</i>
107/08	<i>M. chelonae</i>	260	260	260	260	<i>M. chelonae I</i>
306/08	<i>M. chelonae</i>	260	260	260	140, 120	<i>M. chelonae II</i>
291/07	<i>M. chelonae</i>	260	260	260	260	<i>M. chelonae I</i>
120/08	<i>M. fortuitum</i>	285, 260	170, 150, 110	200, 175, 75	230, 205, 55	<i>M. fortuitum I</i> <sup>(c)</sup>
148/08	<i>M. fortuitum</i>	270, 245	170, 150, 95	185, 160, 85	270, 245	Não identificado
441/07	<i>M. fortuitum</i>	295, 270	175, 110, 95	210, 190, 85	155, 135	Não identificado
496/07	<i>M. fortuitum</i>	260	145, 110	175, 85	260	<i>M. senegalense</i>
337/06	<i>M. fortuitum</i>	300, 280	175, 110, (78*)	(300) <sup>(b)</sup> , 200, 170, 120, 75	240	<i>M. fortuitum VI</i>
9/06	<i>M. fortuitum</i>	300, 280	175, 110, (78*)	(300) <sup>(b)</sup> , 200, 170 120, 75	240	<i>M. fortuitum VI</i>
205/08	<i>M. gordonae</i>	215	215	210	210	<i>M. gordonae</i>
284/08	<i>M. gordonae</i>	215	215	210	210	<i>M. gordonae</i>

<sup>(a)</sup>Por GenoType® Mycobacterium CM/AS. <sup>(b)</sup>Fragmentos a vermelho - fragmentos inespecíficos devido a digestão incompleta dos fragmentos. <sup>(c)</sup>Ver texto para interpretação deste resultado. \*Fragmento não visualizado no gel.

**Tabela 11.** (continuação)

Isolado	Identificação prévia <sup>(a)</sup>	Produtos de amplificação (pb)	Produtos de Restrição (pb)			Identificação PCR-RFLP ITS
			<i>HaeIII</i>	<i>CfoI</i>	<i>TaqI</i>	
349/08	<i>M. gordonae</i>	215	215	215	215	<i>M. gordonae</i>
126/07	<i>M. gordonae</i>	215	215	215	210	<i>M. gordonae</i>
141/07	<i>M. gordonae</i>	215	215	215	210	<i>M. gordonae</i>
151/07	<i>M. gordonae</i>	215	215	215	210	<i>M. gordonae</i>
463/07	<i>M. gordonae</i>	215	215	210	210	<i>M. gordonae</i>
171/07	<i>M. gordonae</i>	215	215	210	210	<i>M. gordonae</i>
235/07	<i>M. gordonae</i>	215	215	215	215	<i>M. gordonae</i>
194/07	<i>M. gordonae</i>	215	215	210	215	<i>M. gordonae</i>
30/08	<i>M. intracellulare</i>	220	90, 85, 45	220	150, 70	<i>M. intracellulare I / M. scrofulaceum Ia</i>
92/08	<i>M. intracellulare</i>	220	90, 85, 45	220	150, 70	<i>M. intracellulare I / M. scrofulaceum Ia</i>
154/08	<i>M. intracellulare</i>	220	125, 90	220	150, 70	<i>M. intracellulare IIa / M. scrofulaceum Ib</i>
164/08	<i>M. intracellulare</i>	220	125, 90	220	150, 70	<i>M. intracellulare IIa / M. scrofulaceum Ib</i>
170/08	<i>M. intracellulare</i>	220	90, 85, 45	220	150, 70	<i>M. intracellulare I / M. scrofulaceum Ia</i>
ATCC 13950 <sup>T</sup>	<i>M. intracellulare</i>	220	90, 85, 45	220	150, 70	<i>M. intracellulare I / M. scrofulaceum Ia</i>
302/08	<i>M. kansasii</i>	225	225	225	155,70	<i>M. kansasii I</i>
8/07	<i>M. kansasii</i>	225	225	225	155, 70	<i>M. kansasii I</i>
27/07	<i>M. kansasii</i>	225	225	225	155, 70	<i>M. kansasii I</i>
128/07	<i>M. kansasii</i>	225	225	225	155, 70	<i>M. kansasii I</i>
245/07	<i>M. kansasii</i>	225	225	225	155, 70	<i>M. kansasii I</i>
60/08	<i>M. peregrinum</i>	285	110, 85, 55, 35	285	285	<i>M. fortuitum IX</i>
462/07	<i>M. peregrinum</i>	280, 240	150, 110, 95	280, 165, 75	280, 240	<i>M. peregrinum I</i> <sup>(c)</sup>
177/08	<i>M. scrofulaceum</i>	290, 215	130, 95, 90, 50, 40	290, 215	290, 145, 140, 75	<i>M. intracellulare / M. scrofulaceum</i> + padrão desconhecido
344/08	<i>M. szulgai</i>	225	85, 70, 65	130, 95	225	<i>M. kansasii IIa / M. szulgai</i>
42/08	<i>M. xenopi</i>	205	130, 75	200	205	<i>M. xenopi</i>
102/08	<i>M. xenopi</i>	205	130, 75	200	205	<i>M. xenopi</i>
159/08	<i>M. xenopi</i>	210	130, 75	200	205	<i>M. xenopi</i>
197/08	<i>M. xenopi</i>	205	135, 75	200	205	<i>M. xenopi</i>
ATCC 27294	<i>M. tuberculosis</i>	225	115, 55, 50	225	220	<i>M. tuberculosis</i>

<sup>(a)</sup>Por GenoType® Mycobacterium CM/AS. <sup>(b)</sup>Fragmentos a vermelho - fragmentos inespecíficos devido a digestão incompleta dos fragmentos. <sup>(c)</sup>Ver texto para interpretação deste resultado. \*Fragmento não visualizado no gel.

A partir de determinado momento, alguns dos produtos de amplificação que eram sujeitos a purificação, não apresentaram produtos resultantes da reacção de restrição, verificou-se posteriormente que a etapa de purificação estava a inibir a restrição enzimática. A partir deste momento optou-se por realizar a restrição enzimática após a etapa de amplificação.



Os resultados foram analisados e comparados com os algoritmos elaborados por Roth *et al.* em 2000, tendo sido possível identificar a maioria (31/50) dos isolados testados, com base nos tamanhos dos fragmentos de amplificação e restrição obtidos. Apesar de ocorrerem pequenas variações nos tamanhos calculados para estes fragmentos, quando comparados com os presentes nos algoritmos de Roth *et al.* (2000), foi possível com este método obter-se a identificação da maioria dos isolados testados, dado que os padrões obtidos são representativos de determinada espécie.

A identificação de micobactérias não tuberculosas ao nível da espécie, através do método proposto, foi exequível para 30 isolados, tendo sido identificadas as espécies *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. senegalense*, *M. peregrinum* e *M. xenopi*. Este método permite também diferenciar facilmente *M. tuberculosis* das micobactérias não tuberculosas, já que é possível com os produtos de amplificação e de restrição com a enzima *HaeIII*, obter um padrão único para a espécie *M. tuberculosis*.

Para os restantes 19 isolados testados, não foi possível obter identificação pelo ITS PCR-RFLP, ou porque os resultados sugerem duas espécies possíveis (17 isolados) ou porque os isolados apresentam padrões não documentados por Roth *et al.* (2000) (2 isolados). Nestes últimos casos, os isolados foram identificados pelo GenoType® Mycobacterium CM como pertencentes às espécies *M. fortuitum* (isolados 148/08 e 441/07).

Os isolados para os quais se obteve mais do que uma identificação possível, correspondem a isolados identificados por GenoType® Mycobacterium CM/AS como *M. avium* (9 isolados), *M. intracellulare* (6 isolados), *M. scrofulaceum* (1 isolado) e *M. szulgai* (1 isolado). É importante referir que este problema se verifica também para as estirpes tipo de *M. avium* (ATCC 25291<sup>T</sup>) e de *M. intracellulare* (ATCC 13950<sup>T</sup>), estando as mesmas incluídas no número de isolados para os quais se obteve mais do que uma identificação possível. Relativamente a estes 17 isolados, não foi possível atribuir uma identificação específica, dado que os resultados obtidos não permitiram diferenciar entre duas espécies possíveis. Assim, não foi possível diferenciar entre *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum* para os isolados 30/08, 92/08, 170/08, 154/08, 164/08, 177/08 e a estirpe de

referência *M. intracellulare* ATCC 13950<sup>T</sup>; entre *M. avium* e *M. bohemicum* para os isolados 176/08, 68/06, 78/06, 92/06, 229/06, 8/05, 189/05, 291/05 e a estirpe de referência *M. avium* ATCC 25291<sup>T</sup> e finalmente, entre *M. kansasii* H<sub>37</sub>R<sub>60</sub> e *M. szulgai* para o isolado 344/08.

No caso do isolado 177/08, além do padrão correspondente às espécies *M. intracellulare* / *M. scrofulaceum*, foi obtido um fragmento de amplificação de 290 pb, bem como fragmentos de restrição adicionais em relação aos padrões de restrição de *M. intracellulare* / *M. scrofulaceum*, o que sugere a presença de uma outra espécie nesta cultura.

Para 28 dos 30 isolados de MNT identificados pelo método ITS PCR-RFLP, a identificação obtida foi concordante com a identificação anteriormente obtida através do GenoType® Mycobacterium CM/AS. Estes isolados pertencem às espécies *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* (apenas três isolados), *M. gordonae*, *M. kansasii* e *M. xenopi*.

As duas discrepâncias verificadas entre a identificação por ITS PCR-RFLP e pelo GenoType® Mycobacterium correspondem aos isolados 60/08 e 496/07. O isolado 60/08 foi identificado pelo GenoType® Mycobacterium CM como *M. peregrinum*, tendo sido identificado como *M. fortuitum* (variante IX) pelo método testado. Em relação ao isolado 496/07, foi identificado pelo GenoType® Mycobacterium CM como *M. fortuitum*, e como *M. senegalense* pelo PCR-RFLP do ITS.

Outros dois isolados, 120/08 e 462/07, foram também identificados através deste método, apesar de apresentarem algumas variações nos tamanhos dos produtos obtidos (amplificação/restrição) em relação aos descritos nos algoritmos de Roth *et al.* (2000).

Para o isolado 120/08, os padrões de amplificação e restrição obtidos sugerem a espécie *M. fortuitum* (Variante I). Contudo, existe uma pequena divergência num dos três fragmentos obtidos após restrição com a enzima *CfoI*, em relação aos descritos no algoritmo. Assim, eram esperados fragmentos de 257, 200 e 79 pb, contudo foram obtidos fragmentos com 200, 175 e 75 pb. Possivelmente o padrão obtido é o mais correcto para as condições de análise utilizadas neste estudo, porém também não se pode deixar de parte, a hipótese de se tratar de um novo padrão

característico de uma variante ainda não descrita pelo autor. Ambos os padrões de amplificação e de restrição com *Hae*III são concordantes com a identificação de *M. fortuitum* variante I.

O isolado 462/07 foi identificado como *M. peregrinum* (variante I). Os padrões resultantes da amplificação e respectivas restrições, apesar de não apresentarem exactamente os tamanhos descritos no algoritmo de Roth *et al.*, apresentam proporções bastante próximas de todos os fragmentos descritos nas diversas etapas (amplificação e restrições com a *Hae*III e *Cfo*I) para esta espécie, sendo que estes padrões não encaixam em mais nenhum dos padrões descritos para as outras espécies. Assim, enquanto Roth *et al.* (2000) descrevem para *M. peregrinum* (variante I) fragmentos de amplificação de 305 e 270 pb, para o isolado 462/07 foram obtidos produtos de amplificação de 280 e 240 pb. Em relação aos fragmentos obtidos na restrição também se verifica alguma discrepância em relação aos descritos no algoritmo, obtendo-se na restrição com *Hae*III fragmentos de 150, 110 e 95 pb em vez de 173, 115 e 97 pb. Em relação aos fragmentos obtidos após a restrição com a *Cfo*I, foram obtidos fragmentos com 280, 165 e 75 pb, enquanto os descritos por Roth *et al.* (2000) correspondem a 305, 189 e 81 pb. Verifica-se que as diferenças entre os fragmentos obtidos e aqueles descritos no algoritmo de Roth *et al.* (2000), são maiores nos fragmentos de maiores dimensões. Estas discrepâncias podem ter origem nas condições de análise utilizadas no estudo, já que diferem das utilizadas pelo autor do método.

Verificaram-se ainda outras discrepâncias entre os resultados obtidos e os descritos por Roth *et al.* (2000), nomeadamente na não visualização de fragmentos de menores dimensões (casos dos isolados 118/08, 9/06 e 337/06), ou na visualização de fragmentos resultantes de digestão incompleta (isolados 9/06 e 337/06). Em qualquer destes casos, estas discrepâncias não foram consideradas para a atribuição da espécie (Tabela 11).

De um modo geral, os produtos de restrição obtidos com a enzima *Hae*III originaram os padrões de restrição (RFLP's) mais discriminativos, tendo sido obtidos 13 padrões de restrição. Em relação às restantes enzimas utilizadas, *Cfo*I e *Taq*I, foram obtidos nove padrões de restrição para

cada. Assim, os padrões de restrição obtidos com *HaeIII*, em conjunto com o conhecimento dos tamanhos dos fragmentos amplificados deram origem aos padrões de RFLP mais discriminativos.

A restrição dos produtos de amplificação com *HaeIII* deu origem, na maioria dos casos, a dois ou três fragmentos de restrição, tendo sido obtidos quatro fragmentos de restrição para o isolado 60/08 e cinco fragmentos para o isolado 177/08. No entanto, 15 dos 50 isolados testados não apresentaram restrição com esta enzima. Quando se utilizou a enzima *CfoI*, foram obtidos produtos de restrição em apenas 18 dos 50 isolados testados (36%), originando na maioria dos casos dois a três fragmentos. Por último, a enzima *TaqI* gerou produtos de restrição em 19 dos 50 isolados (38%), sendo originados na maioria dos casos dois fragmentos.

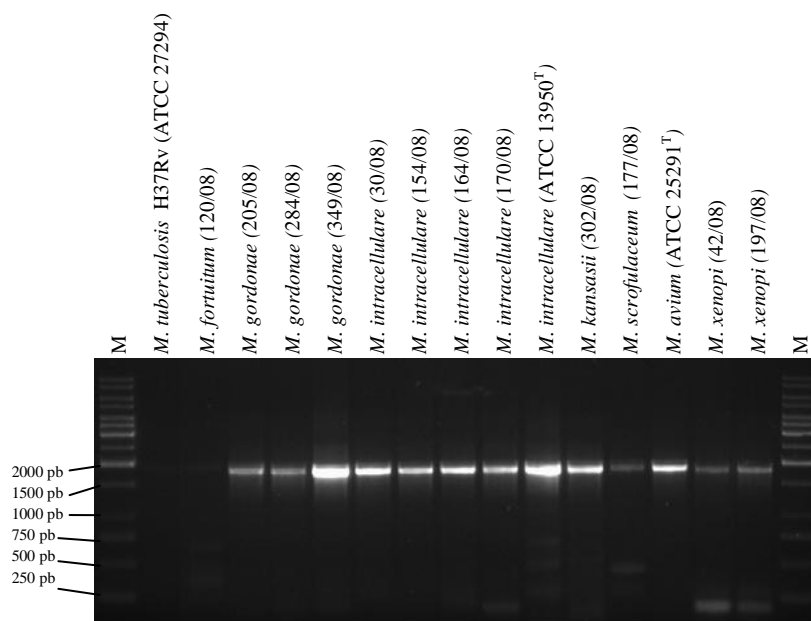
Os produtos de restrição obtidos com enzima *HaeIII*, foram analisados juntamente com o conhecimento dos produtos de amplificação, tal como sugerem os algoritmos de Roth *et al.* (2000), o que resultou em 16 conjuntos de padrões, dos quais 10 (62,5%) eram únicos e suficientes para permitir a identificação ao nível da espécie. Os restantes seis padrões (37,5%) não permitiram a identificação dos isolados ao nível da espécie, necessitando portanto de uma análise adicional, com outras enzimas de restrição. No entanto, os padrões adicionais obtidos com a enzima *CfoI* não permitiram a identificação da maioria dos isolados testados, embora, tal como referido por Roth *et al.* (2000) na prática seja aconselhável a restrição dos produtos de amplificação com ambas as enzimas *HaeIII* e *CfoI*, pois a fiabilidade dos resultados da enzima *HaeIII* é aumentada, se for confirmada por uma segunda enzima de restrição.

Dado que nem a enzima *HaeIII* nem a *CfoI* foram capazes de diferenciar entre algumas espécies de micobactérias com elevada similaridade nas suas sequências, nomeadamente *M. avium* e *M. bohemicum*, *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum*, *M. chelonae* e *M. abscessus*, *M. kansasii* e *M. szulgai*, testou-se uma terceira enzima de restrição, *TaqI*. Esta enzima permitiu diferenciar as espécies *M. abscessus* (118/08 e 188/08) e *M. chelonae* (107/08, 306/08 e 291/07), bem como *M. kansasii* (variante I) (302/08, 8/07, 27/07, 128/07 e 245/07).

## 2. PCR RFLP da região ITS e regiões adjacentes

Este método, baseado na amplificação da região ITS e das suas regiões adjacentes, foi testado em apenas 25 isolados (22 isolados clínicos da colecção de culturas do laboratório de Micobactérias do IHMT, e as três estirpes de referência).

As reacções de PCR foram realizadas com os “primers” descritos por Katoch *et al.* em 2007, tendo os produtos de amplificação sido observados após electroforese em gel de agarose (Figura 6).



**Figura 6.** Electroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de amplificação da região ITS e regiões adjacentes. M: marcador molecular Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder.

Foi obtida amplificação da região pretendida para apenas 15 dos 25 isolados testados (60%), tendo o fragmento amplificado um tamanho aproximado de 1800 pb.

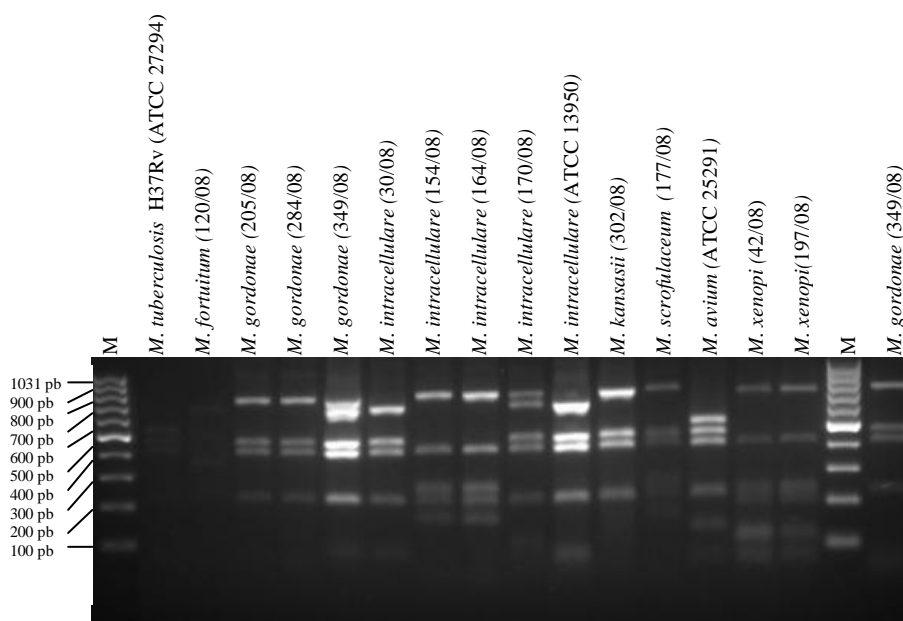
Os isolados para os quais foi obtido produto de amplificação, foram previamente identificados através do GenoType® Mycobacterium como pertencentes às espécies *M. avium* (176/08, ATCC 25291<sup>T</sup>), *M. gordonae* (205/08, 284/08, 349/08), *M. intracellulare* (30/08, 92/08, 154/08, 164/08, 170/08 e ATCC 13950<sup>T</sup>), *M. kansasii* (302/08), *M. scrofulaceum* (177/08) e *M. xenopi* (42/08 e 197/08).

Não foi visualizada amplificação para os isolados 120/08 (*M. fortuitum*), 60/08 (*M. peregrinum*), 102/08 (*M. xenopi*), 159/08 (*M. xenopi*), 344/08 (*M. szulgai*) e H37Rv (*M.*

*tuberculosis*), enquanto para os isolados 118/08 (*M. abcessus*), 188/08 (*M. abcessus*), 107/08 (*M. chelonae*) e 148/08 (*M. fortuitum*) apenas foram visualizados produtos de amplificação não específicos.

A diferenciação entre espécies de MNT e *M. tuberculosis* não foi possível através deste método, já que não foi obtido produto de amplificação para a estirpe de referência de *M. tuberculosis* H37Rv.

Para se poder efectuar a identificação dos diferentes isolados para os quais se obteve amplificação, foi necessário recorrer à restrição dos produtos de PCR com a enzima de restrição *Hha*I. Os produtos de restrição foram visualizados após electroforese em gel de agarose (Figura 7).



**Figura 7. Electroforese em gel de agarose (2%) dos produtos resultantes da restrição dos produtos amplificação da região ITS e regiões adjacentes com a enzima de restrição *Hha*I.**  
M: marcador molecular Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder.

Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 12, onde se apresentam os produtos de amplificação resultantes da técnica de PCR, bem como os fragmentos obtidos após a sua restrição com a enzima *Hha*I.

**Tabela 12. Identificação de micobactérias por PCR-RFLP 16S-ITS-23S através da análise dos fragmentos obtidos após amplificação e restrição dos produtos amplificados com a enzima *HhaI*.**

Isolado	Identificação prévia <sup>(a)</sup>	Produtos amplificados <sup>(b)</sup> (pb)	Produtos de restrição <i>HhaI</i> <sup>(c,d)</sup> (pb)	Identificação PCR-RFLP de 16S-ITS-23S
118/08	<i>M. abscessus</i>	285, 175, 95	n.r.	Não identificado
188/08	<i>M. abscessus</i>	280, 170, 125	n.r.	Não identificado
176/08	<i>M. avium</i>	1800	545, 475, 420, 215	<i>M. avium</i>
ATCC 25291 <sup>T</sup>	<i>M. avium</i>	1800	545, 475, 415, 210	<i>M. avium</i>
107/08	<i>M. chelonae</i>	320, 225, 160	n.r.	Não identificado
120/08	<i>M. fortuitum</i>	-	-	Não identificado
148/08	<i>M. fortuitum</i>	330, 240, 190, 135, 95	n.r.	Não identificado
205/08	<i>M. gordonae</i>	1800	765, 460, 410, 225	Não identificado (Novo padrão)
284/08	<i>M. gordonae</i>	1800	765, 455, 405, 225	Não identificado (Novo padrão)
349/08	<i>M. gordonae</i>	1800	780, 470, 430, 235	Não identificado (Novo padrão)
30/08	<i>M. intracellulare</i>	1800	670, 455, 395, 215	<i>M. intracellulare</i>
92/08	<i>M. intracellulare</i>	1800	680, 475, 420, 225	<i>M. intracellulare</i>
154/08	<i>M. intracellulare</i>	1800	800, 405, 250, 205, 150	Não identificado (Novo padrão)
164/08	<i>M. intracellulare</i>	1800	795, 405, 255, 210, 145	Não identificado (Novo padrão)
170/08	<i>M. intracellulare</i>	1800	(805), 690, 475, 410, 215	<i>M. intracellulare</i>
ATCC 13950 <sup>T</sup>	<i>M. intracellulare</i>	1800	675, 475, 405, 220	<i>M. intracellulare</i>
302/08	<i>M. kansasii</i>	1800	800, 490, 425, 215	<i>M. kansasii</i>
60/08	<i>M. peregrinum</i>	-	-	Não identificado
177/08	<i>M. scrofulaceum</i>	1800	860, 505, 425	<i>M. scrofulaceum</i>
344/08	<i>M. szulgai</i>	-	-	Não identificado
42/08	<i>M. xenopi</i>	1800	840, 450, 245, 110, 80	Não identificado (Novo padrão)
102/08	<i>M. xenopi</i>	-	-	Não identificado
159/08	<i>M. xenopi</i>	-	-	Não identificado
197/08	<i>M. xenopi</i>	1800	830, 445, 250, 115, 80	Não identificado (Novo padrão)
ATCC 27294	<i>M. tuberculosis</i>	-	-	Não identificado

<sup>(a)</sup> por GenoType® Mycobacterium CM/AS. <sup>(b)</sup> - : não ocorreu amplificação. <sup>(c)</sup> n.r.: não foi efectuada restrição, porque não foi obtido fragmento de amplificação específico. <sup>(d)</sup> Fragmentos a vermelho - fragmentos inespecíficos devido a digestão incompleta dos fragmentos

Os resultados obtidos após a restrição com *HhaI* foram analisados e comparados com os apresentados por Katoch *et al.* (2007). Com base nos tamanhos dos fragmentos obtidos, apenas foi possível identificar oito dos 25 isolados testados (32%). A identificação obtida para estes oito isolados foi concordante com a anteriormente obtida através do sistema de identificação GenoType® Mycobacterium.

Estes oito isolados foram identificados como pertencentes às espécies *M. avium* (176/08 e ATCC 25291<sup>T</sup>), *M. intracellulare* (30/08, 92/08, 170/08 e ATCC 13950<sup>T</sup>), *M. kansasii* (302/08) e *M. scrofulaceum* (177/08).

Para os restantes 17 isolados testados (68%), não foi possível obter uma identificação. Para dez isolados (40%), não foi obtida amplificação da região alvo, enquanto os restantes sete isolados (28%) apresentaram padrões de restrição não documentados por Katoch *et al.* (2007) e por consequência não foram identificados.

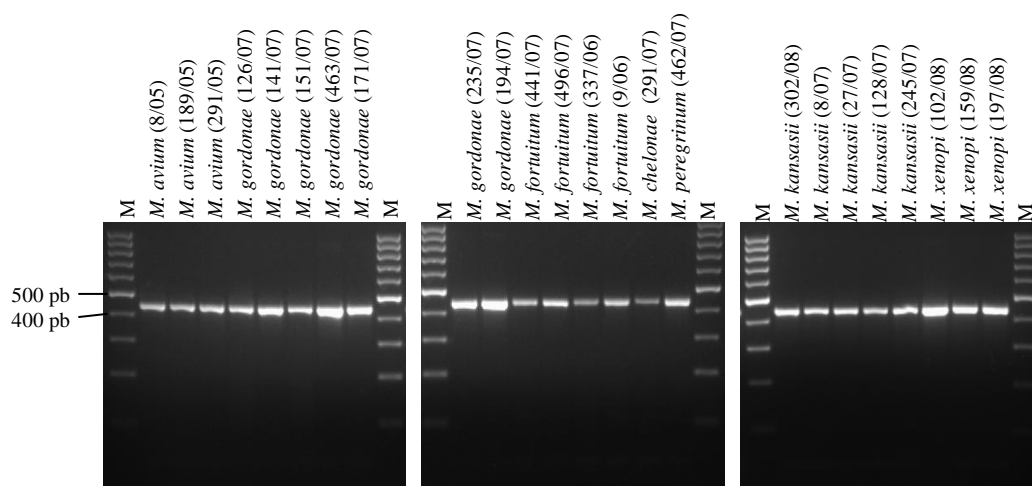
Alguns dos isolados para os quais não foi obtida amplificação correspondem a espécies que não foram testadas por Katoch *et al.* (2007) no seu estudo, tais como *M. abcessus*, *M. peregrinum*, *M. szulgai* e *M. xenopi*. No entanto, verificou-se também falha de amplificação para isolados de espécies anteriormente estudadas por Katoch *et al.*, nomeadamente *M. fortuitum* e *M. tuberculosis*.

Os restantes sete isolados (205/08, 284/08, 349/08, 154/08, 164/08, 42/08 e 197/08) deram origem a um produto de amplificação do tamanho esperado, i.e, 1800 pb, mas os produtos resultantes da restrição com *HhaI* não foram concordantes com os descritos por Katoch *et al.* (2007). Estes isolados foram anteriormente identificados pelo GenoType® CM/AS como *M. gordonae*, *M. intracellulare* ou *M. xenopi* (Tabela 12).



### 3. Gene *hsp65*

A identificação de MNT através da amplificação de um fragmento interno ao gene *hsp65*, utilizando os “primers” Tb11 e Tb12 foi testada para os 50 isolados. Os produtos resultantes da técnica de PCR foram observados após electroforese em gel de agarose (Figura 8).

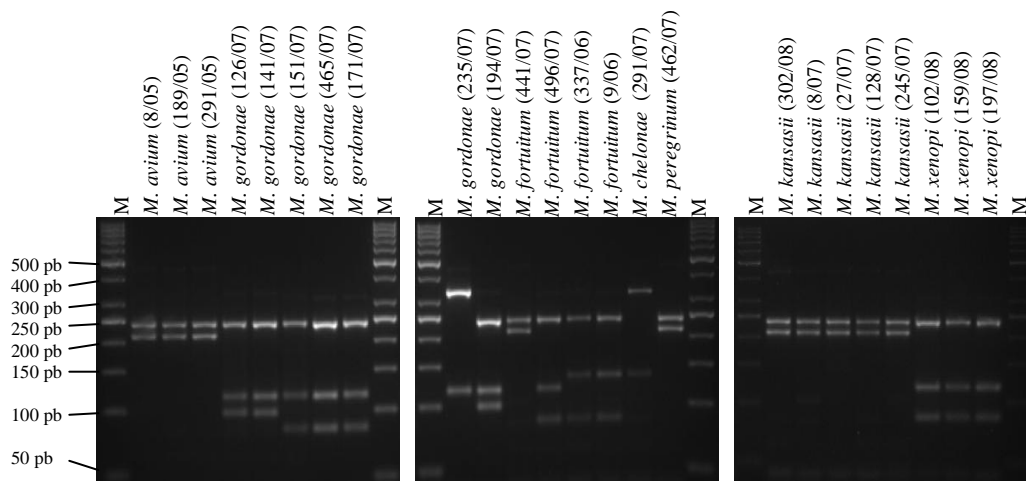


**Figura 8. Electroforese em gel de agarose (3%) dos produtos resultante da amplificação do gene *hsp65*.**  
M: marcador molecular Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder.

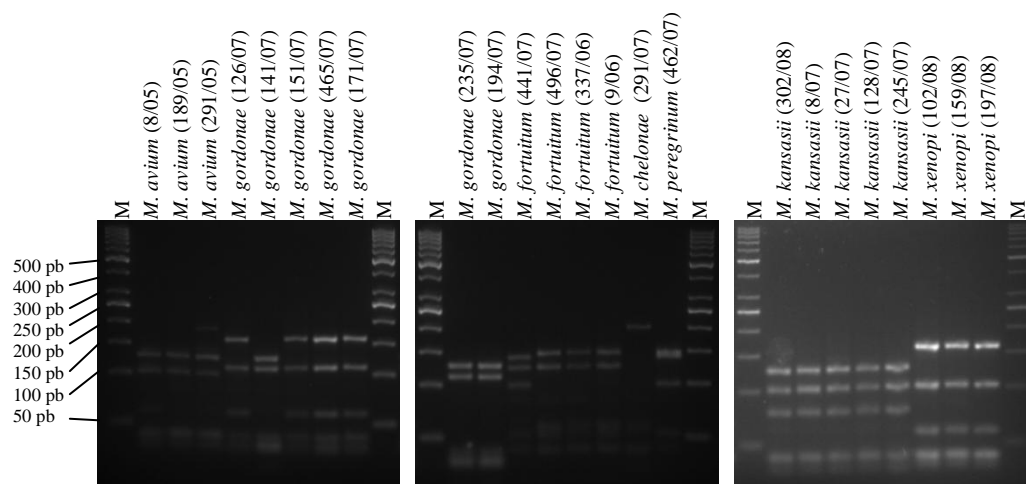
Todos os isolados testados originam produtos de amplificação, com excepção do isolado 60/08, identificado como *M. peregrinum* pelo GenoType® Mycobacterium CM.

Para os restantes 49 isolados, foi visualizado apenas um fragmento de amplificação, cujo tamanho variou entre os 435 e 445 pb, como pode ser observado na Figura 8.

Com vista à identificação dos diferentes isolados, foi necessário realizar a restrição dos produtos previamente amplificados com as enzimas de restrição *BstEII* e *HaeIII*. Os produtos de restrição foram separados por electroforese em gel de agarose Metaphor® (Figuras 9 e 10).



**Figura 9.** Electroforese em gel de agarose Metaphor® (3,5%) dos produtos resultante da restrição dos produtos de amplificação do gene *hsp65* com a enzima de restrição *BstEII*. M: marcador molecular Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder.



**Figura 10.** Electroforese em gel de agarose Metaphor® (3,5%) dos produtos resultante da restrição dos produtos de amplificação do gene *hsp65* com a enzima de restrição *HaeIII*. M: marcador molecular Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder.

Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 13, onde se encontram descritos os produtos de amplificação do gene *hsp65*, bem como os fragmentos de restrição obtidos com as enzimas *BstEII* e *HaeIII*.

**Tabela 13. Identificação de micobactérias por PCR-RFLP de *hsp65*, através da análise dos fragmentos obtidos após amplificação e restrição dos produtos amplificados com *Bst*EII e *Hae*III.**

Isolado	Identificação prévia <sup>(a)</sup>	Produtos de amplificação (pb)	Produtos de restrição (pb)		Identificação PCR-RFLP de <i>hsp65</i>
			<i>Bst</i> EII	<i>Hae</i> III	
118/08	<i>M. abscessus</i>	435	230, 205	190, 70, 60	<i>M. abscessus II</i>
188/08	<i>M. abscessus</i>	435	235, 210	145, 70, 60	<i>M. abscessus I</i>
176/08	<i>M. avium</i>	435	230, 205	135, 100, 50	<i>M. avium</i>
68/06	<i>M. avium</i>	445	240, 215	135, 110	<i>M. avium</i>
78/06	<i>M. avium</i>	440	240, 215	130, 105, 50	<i>M. avium</i>
92/06	<i>M. avium</i>	435	240, 215	130, 105, 50	<i>M. avium</i>
229/06	<i>M. avium</i>	435	240, 210	130, 105	<i>M. avium</i>
8/05	<i>M. avium</i>	435	240, 210	125, 100, 50	<i>M. avium</i>
189/05	<i>M. avium</i>	435	240, 215	125, 100	<i>M. avium</i>
291/05	<i>M. avium</i>	435	240, 210	125, 100	<i>M. avium</i>
ATCC 25291 <sup>T</sup>	<i>M. avium</i>	440	240, 215	130, 105	<i>M. avium</i>
107/08	<i>M. chelonae</i>	445	305, 130	195, 60	<i>M. chelonae I</i>
306/08	<i>M. chelonae</i>	445	310, 135	200, 60	<i>M. chelonae I</i>
291/07	<i>M. chelonae</i>	445	310, 135	205, 60	<i>M. chelonae I</i>
120/08	<i>M. fortuitum</i>	435	245, 135, 85	145, 125, 60	<i>M. fortuitum</i>
148/08	<i>M. fortuitum</i>	435	245, 215	140, 100	Não identificado
441/07	<i>M. fortuitum</i>	440	245, 220	140, 120, 100	<i>M. porcinum/</i> <i>M. scrofulaceum</i>
496/07	<i>M. fortuitum</i>	435	245, 120, 85	145, 125, 60	<i>M. senegalense</i>
337/06	<i>M. fortuitum</i>	440	245, 130, 85	145, 125, 60	<i>M. fortuitum</i>
9/06	<i>M. fortuitum</i>	435	245, 130, 85	145, 125, 60	<i>M. fortuitum</i>
205/08	<i>M. gordonae</i>	435	230, 115, 80	160, 110, 60	<i>M. gordonae I</i>
284/08	<i>M. gordonae</i>	435	235, 115, 80	160, 110, 60	<i>M. gordonae I</i>
349/08	<i>M. gordonae</i>	435	230, 115, 85	160, 110, 60	<i>M. gordonae I</i>
126/07	<i>M. gordonae</i>	435	245, 115, 100	155, 110, 60	<i>M. malmoense</i>
141/07	<i>M. gordonae</i>	435	240, 115, 100	125, 105	<i>M. gordonae III</i>
151/07	<i>M. gordonae</i>	435	240, 115, 80	160, 105, 55	<i>M. gordonae I</i>
465/07	<i>M. gordonae</i>	435	235, 115, 80	155, 110, 55	<i>M. gordonae I</i>
171/07	<i>M. gordonae</i>	435	240, 115, 85	160, 110, 55	<i>M. gordonae I</i>
235/07	<i>M. gordonae</i>	435	330, 120	125, 110, (*70 - 60)	<i>M. gordonae IV</i>
194/07	<i>M. gordonae</i>	435	240, 115, 100	125, 110	<i>M. gordonae III</i>
030/08	<i>M. intracellulare</i>	435	235, 120, 100	140, 125, 60	<i>M. intracellulare</i>
092/08	<i>M. intracellulare</i>	435	235, 120, 100	145, 125, 60	<i>M. intracellulare</i>
154/08	<i>M. intracellulare</i>	435	245, 210	130, 105, 50	<i>M. avium</i>

<sup>(a)</sup>Por GenoType® Mycobacterium CM/AS. \*: Fragmento não visualizado no gel.

**Tabela 13.** (continuação)

Isolado	Identificação prévia <sup>(a)</sup>	Produtos de amplificação <sup>(b)</sup> (pb)	Produtos de restrição <sup>(b)</sup> (pb)		Identificação PCR-RFLP <i>hsp65</i>
			<i>Bst</i> EI	<i>Hae</i> III	
164/08	<i>M. intracellulare</i>	445	245, 210	130, 105, 50	<i>M. avium</i>
170/08	<i>M. intracellulare</i>	435	235, 120, 100	145, 130, (*60)	<i>M. intracellulare</i>
ATCC 13950 <sup>T</sup>	<i>M. intracellulare</i>	435	235, 120, 100	145, 125, 60	<i>M. intracellulare</i>
302/08	<i>M. kansasii</i>	445	235, 210	125, 100, 75	<i>M. kansasii</i> I
8/07	<i>M. kansasii</i>	445	235, 210	125, 100, 75	<i>M. kansasii</i> I
27/07	<i>M. kansasii</i>	445	235, 210	125, 100, 75	<i>M. kansasii</i> I
128/07	<i>M. kansasii</i>	445	235, 210	130, 105, 75	<i>M. kansasii</i> I
245/07	<i>M. kansasii</i>	445	235, 210	125, 100, 75	<i>M. kansasii</i> I
60/08	<i>M. peregrinum</i>	-	-	-	Não identificado
462/07	<i>M. peregrinum</i>	435	245, 215	150, 140, 100	<i>M. peregrinum</i> I
177/08	<i>M. scrofulaceum</i>	445	240, 210	140, 125, 100	<i>M. porcinum</i> / <i>M. scrofulaceum</i>
344/08	<i>M. szulgai</i>	435	435	130, 105, 70	<i>M. szulgai</i>
042/08	<i>M. xenopi</i>	435	235, 120, 85	160, 105	<i>M. xenopi</i>
102/08	<i>M. xenopi</i>	435	230, 120, 85	160, 105, 60	<i>M. xenopi</i>
159/08	<i>M. xenopi</i>	445	235, 120, 85	160, 105, 60	<i>M. xenopi</i>
197/08	<i>M. xenopi</i>	445	235, 120, 85	160, 105, 60	<i>M. xenopi</i>
ATCC 27294 <sup>T</sup>	<i>M. tuberculosis</i>	435	235, 115, 85	150, 125, 65	<i>M. tuberculosis</i> complex

<sup>(a)</sup> Por GenoType® Mycobacterium CM/AS. <sup>(b)</sup> - : não ocorreu amplificação. \*: Fragmento não visualizado no gel.

Após a reacção amplificação, os produtos amplificados foram sujeitos a uma etapa de purificação e só posteriormente realizou-se a sua restrição com as enzimas. Em todos os produtos purificados não foi possível obter fragmentos de restrição, tal como ocorreu anteriormente para parte dos isolados no método PCR-RFLP de ITS. Assim optou-se por realizar a restrição enzimática após a etapa de amplificação.

Os resultados foram analisados e comparados com os algoritmos elaborados por Telenti *et al.* (1993), Devallois *et al.* (1997) e Brunello *et al.* (2001). A identificação dos isolados foi efectuada com base na comparação dos tamanhos dos fragmentos obtidos com os descritos nos algoritmos. Foi possível obter uma identificação ao nível da espécie para 46 dos 49 isolados de MTN testados (94%), correspondendo às espécies *M. abscessus*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. senegalense*, *M. intracellulare*, *M. peregrinum*, *M. szulgai* e *M. xenopi*.

O método aplicado não só permitiu a identificação ao nível da espécie, como também possibilitou a sua discriminação ao nível de subgrupos ou variantes em determinadas espécies. Deste modo, foi possível diferenciar dois subgrupos dentro da espécie *M. abscessus* (variantes I e II), e três subgrupos de *M. gordonae* (variantes I, III e IV).

Verificou-se ainda que *M. tuberculosis* é diferenciado das MNT, já que apresentou um conjunto de fragmentos de restrição com as enzimas *BstEII* e *HaeIII*, que o permite diferenciar das outras micobactérias. Contudo, os algoritmos utilizados apenas identificam a estirpe testada como pertencente ao complexo *M. tuberculosis*, não permitindo a sua identificação ao nível da espécie.

A identificação dos diferentes isolados pelo método proposto foi concordante com a identificação anteriormente realizada através do GenoType® Mycobacterium para 42 dos 46 isolados (91%). Dentro dos 42 isolados em que esta identificação foi concordante, incluem-se os isolados 170/08 e 235/07, apesar de para estes isolados não se terem visualizado os fragmentos de restrição com *HaeIII* de menores dimensões (60-70 pb).

Os quatro isolados para os quais a identificação não foi concordante com a previamente obtida pelo GenoType® Mycobacterium (496/07, 126/07, 154/08 e 164/08), correspondem a diferentes espécies. O isolado 496/07, anteriormente identificado como *M. fortuitum*, foi identificado por PCR-RFLP *hsp65* como *M. senegalense*. O isolado 126/07, anteriormente identificado como *M. gordonae*, foi identificado através deste método como *M. malmoeense*. Finalmente, os isolados 154/08 e 164/08, previamente identificados como *M. intracellulare*, foram classificados como *M. avium* (Tabela 13).

Em relação aos restantes quatro isolados (60/08, 441/07, 148/08 e 177/08), não foi possível obter identificação específica por PCR-RFLP *hsp65* por diferentes razões. Para o isolado 60/08 não foi obtida amplificação, não permitindo deste modo a sua posterior análise e sua identificação. Em relação aos isolados 441/07 e 177/08, não foi possível diferenciar entre *M. porcinum*/*M. scrofulaceum*, com base nos resultados obtidos e utilizando como referência o algoritmo de Brunello *et al.* (2001). Por outro lado, através do algoritmo de Telenti *et al.* (1993) e Devallois *et al.*

(1997) a diferenciação torna-se ainda mais difícil, já que as espécies *M. porcinum*, *M. scrofulaceu* e *M. peregrinum* apresentam padrões muito semelhantes e devido ao erro associado à análise dos resultados, não é possível diferencia-las entre si. Por último, os padrões de restrição obtidos para o isolado 148/08 não correspondem a nenhuma das espécies descritas nos algoritmos.

Verificou-se que os padrões de restrição obtidos se aproximam bastante mais dos descritos no algoritmo de Brunello *et al.* (2001), do que dos padrões documentados por Telenti *et al.* (1993) e Devallois *et al.* (1997). Deste modo, verificou-se que os padrões de restrição obtidos com a enzima *HaeIII*, apresentaram em relação ao algoritmo de Brunello *et al.* (2001) diferenças na sua maioria de 5 pb, enquanto que em relação aos padrões publicados por Telenti *et al.* (1993) e Devallois *et al.* (1997), apresentam, na maioria dos casos, variações de 10 a 15 pb. Por outro lado, também se verificou que os tamanhos dos fragmentos de restrição obtidos eram, de um modo geral, inferiores aos descritos nos algoritmos de Telenti *et al.* (1993) e Devallois *et al.* (1997), especialmente nos fragmentos de maiores dimensões. Tal facto também é perceptível quando se comparam os tamanhos dos fragmentos descritos por Brunello *et al.* (2001) com os de Telenti *et al.* (1993) e os de Devallois *et al.* (1997). Por último, os padrões de restrição obtidos por Brunello *et al.* (2001) com a enzima *HaeIII*, apresentavam maior número de fragmentos que os restantes algoritmos analisados, sendo esses fragmentos descritos inferiores a 60 pb. Alguns desses fragmentos também foram visualizados através das condições de análise utilizadas neste estudo.

Assim, alguns isolados apenas foram identificados pelo algoritmo de Brunello *et al.* (2001), devido às diferenças existentes nos padrões de restrição publicados nos diversos algoritmos. Entre os referidos isolados encontram-se 120/08, 337/06 e 9/06, identificados por PCR-RFLP *hsp65* como *M. fortuitum* e o 496/07, identificado como *M. senegalense*. Para identificar a espécie *M. fortuitum* nos algoritmos de Telenti *et al.* (1993) e Devallois *et al.* (1997) é necessário obter o padrão de restrição 245, 125/120, 80 pb para a enzima *BstEII*. Contudo para o algoritmo de Brunello *et al.* (2001) é preciso o padrão de restrição é 234±3, 131±5, 85±3 pb. Comprovou-se assim que os

padrões obtidos neste trabalho eram melhor analisados através do algoritmo de Brunello *et al.* (2001).

Por outro lado, a identificação do isolado 118/08 foi só possível através do algoritmo de Devallois *et al.* (1997), já que nos restantes algoritmos não apresentam os padrões de restrição para a identificação de uma segunda variante da espécie *M. abcessus*.

## V – DISCUSSÃO

As micobactérias não tuberculosas (MNT) constituem um grupo diversificado de bactérias, que podem colonizar ou causar infecções oportunistas tanto em indivíduos imunocompetentes como imunodeprimidos (Wu *et al.*, 2009). Entre as infecções causadas por MNT, contam-se linfadenites, doenças pulmonares, cutâneas e disseminadas (Richard *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2009).

A selecção apropriada do antibiótico a administrar é essencial para o sucesso da terapêutica e depende da identificação atempada da micobactéria responsável pela infecção (Barreto *et al.*, 2000; Yam *et al.*, 2006). Em particular, a diferenciação entre MNT e *M. tuberculosis* é crucial, não só em termos da patologia e sua gravidade, mas também ao nível da saúde pública e da selecção da terapêutica. Relativamente à saúde pública, esta diferenciação é importante, pois a infecção provocada por MNT é adquirida principalmente a partir do meio ambiente, através da ingestão, inalação ou inoculação, ao contrário da infecção provocada por *M. tuberculosis*, que depende da transmissão directa de pessoa para pessoa, através de aerossóis. Ao nível da terapêutica, esta diferenciação é da maior importância, já que a susceptibilidade aos antibióticos é diferente entre MNT e *M. tuberculosis* (Piersimoni & Scarparo, 2008). Em países com uma elevada incidência de tuberculose, e em particular casos de tuberculose multi-resistente (MDR-TB, de “multidrug-resistant *M. tuberculosis*”), tal como Portugal (Direcção Geral de Saúde, 2008), o insucesso da terapêutica com isoniazida e rifanpicina, pode ser incorrectamente interpretado como se devendo a MDR-TB (Couto *et al.*, 2010), dado que muitas MNT são resistentes a estes antibióticos (Richard *et al.*, 1997; Griffith *et al.*, 2007).

Os métodos convencionais de identificação de micobactérias baseiam-se nas suas características de crescimento e em testes bioquímicos. Dado que estes processos são demorados e trabalhosos, podendo também originar resultados dúbios, tem sido feito um esforço para se desenvolverem métodos de identificação mais rápidos e precisos, nomeadamente métodos de identificação moleculares (Kirschner *et al.*, 1993; Barreto *et al.*, 2000; Kellogg *et al.*, 2001; Mijs *et*



*al.*, 2002; Leite *et al.*, 2005; Yam *et al.*, 2006). O desenvolvimento nos últimos anos de vários métodos de identificação de micobactérias baseados em ácidos nucleicos, veio melhorar bastante a capacidade de identificação de MNT, permitindo também a documentação de novas espécies (Dvorska, 2001; da Silva *et al.*, 2001; Soini & Musser, 2001; Leão *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2005; Yam *et al.*, 2006; Neonakis *et al.*, 2008).

Por outro lado, o acréscimo da incidência de infecções provocadas por MNT nos últimos anos, bem como o aumento da morbidade e mortalidade correspondentes (Falkinham, 2003; Primm *et al.*, 2004; Iwen *et al.*, 2006; Johansen, 2006; Wu *et al.*, 2009), vieram tornar mais premente a necessidade de identificar e diferenciar micobactérias não tuberculosas de uma forma rápida, fácil de executar e com uma boa relação custo-eficácia (Leite *et al.*, 2005).

Nesta Dissertação, compararam-se os resultados obtidos através de um sistema de identificação comercial, o GenoType® Mycobacterium CM/AS com os resultados obtidos por três métodos de identificação molecular “in-house”, baseados no PCR-RFLP de diferentes regiões ou genes.

As micobactérias estudadas neste trabalho englobam *M. tuberculosis* e onze espécies de MNT, nomeadamente *M. abscessus*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai* e *M. xenopi*. A escolha destes isolados clínicos foi efectuada de acordo com a sua frequência de isolamento e identificação pelo GenoType® CM/AS no laboratório de Micobactérias do IHMT durante os últimos quatro anos (Couto *et al.*, 2010; dados não publicados), pretendendo-se assim que estes métodos de identificação fossem avaliados de acordo com as necessidades de diagnóstico deste laboratório.

## **1. Capacidade de identificação de MNT**

Comparando os três métodos de identificação testados, o método com o qual foi identificado o maior número de isolados, foi o baseado no PCR-RFLP do gene *hsp65*, seguido pelo método baseado no PCR-RFLP da região ITS (Tabela 14). O método baseado no PCR-RFLP do gene *hsp65*

identificou 46 dos 49 isolados de MNT testados, correspondendo a 93,8% dos isolados. Dos 46 resultados de identificação obtidos através deste método, 42 foram concordantes com a identificação obtida pelo método GenoType® Mycobacterium CM/AS, correspondendo a 91,3% de concordância.

O método PCR-RFLP da região ITS permitiu a identificação de 30 dos 49 isolados de MNT testados (61,2%), e para 28 destes isolados, o resultado foi concordante com a identificação previamente obtida pelo GenoType® Mycobacterium CM/AS (93,3% de concordância). No entanto, 17 dos 19 isolados para os quais não foi obtida uma identificação definitiva, poderão ser facilmente identificados, através da restrição dos seus produtos de amplificação com enzimas de restrição adicionais. Este passo adicional elevaria a taxa de identificação deste método de 61% para 96%, tornando-o assim um método bastante razoável para a identificação de micobactérias.

O método baseado no PCR-RFLP da região ITS e regiões adjacentes (16S e 23S rDNA) não foi considerado um método fiável para a identificação de MNT, já que apenas foram identificados correctamente 8 de 25 isolados testados, a que corresponde uma taxa de identificação de 32%.

**Tabela 14. Comparação entre os resultados obtidos com os métodos de identificação testados neste estudo.**

Isolado	Identificação obtida			
	GenoType® Mycobacterium CM/AS	PCR-RFLP		
		ITS	gene <i>hsp65</i>	16S-ITS-23S <sup>(a,b)</sup>
118/08	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus II</i>	-
188/08	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus I</i>	-
176/08	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> / <i>M. bohemicum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
68/06	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> / <i>M. bohemicum</i>	<i>M. avium</i>	
78/06	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> / <i>M. bohemicum</i>	<i>M. avium</i>	
92/06	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> / <i>M. bohemicum</i>	<i>M. avium</i>	
229/06	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> / <i>M. bohemicum</i>	<i>M. avium</i>	
8/05	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> / <i>M. bohemicum</i>	<i>M. avium</i>	
189/05	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> / <i>M. bohemicum</i>	<i>M. avium</i>	
291/05	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> / <i>M. bohemicum</i>	<i>M. avium</i>	
ATCC 25291	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i> / <i>M. bohemicum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>
107/08	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae I</i>	<i>M. chelonae I</i>	-
306/08	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae II</i>	<i>M. chelonae I</i>	
291/07	<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae I</i>	<i>M. chelonae I</i>	
120/08	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	-
148/08	<i>M. fortuitum</i>	Não identificado	Não identificado	-
441/07	<i>M. fortuitum</i>	Não identificado	<i>M. porcinum</i> / <i>M. scrofulaceum</i>	
496/07	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. senegalense</i>	<i>M. senegalense</i>	
337/06	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum VI</i>	<i>M. fortuitum</i>	
9/06	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum VI</i>	<i>M. fortuitum</i>	
205/08	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae I</i>	Não identificado
284/08	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae I</i>	Não identificado
349/08	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae I</i>	Não identificado
126/07	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. malmoense</i>	
141/07	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae III</i>	
151/07	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae I</i>	
465/07	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae I</i>	
171/07	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae I</i>	
235/07	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae IV</i>	
194/07	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae III</i>	
30/08	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare I</i> / <i>M. scrofulaceum Ia</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>

<sup>(a)</sup> - Não ocorreu amplificação <sup>(b)</sup> Campos a cinzento – isolados que não foram testados

**Tabela 14.** (continuação).

Isolado	Identificação obtida			
	GenoType® Mycobacterium CM/AS	PCR-RFLP		
		ITS	gene <i>hsp65</i>	16S-ITS-23S <sup>(a,b)</sup>
92/08	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i> I/ <i>M. scrofulaceum</i> Ia	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
154/08	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i> IIa/ <i>M. scrofulaceum</i> Ib	<i>M. avium</i>	Não identificado
164/08	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i> IIa/ <i>M. scrofulaceum</i> Ib	<i>M. avium</i>	Não identificado
170/08	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i> I/ <i>M. scrofulaceum</i> Ia	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
ATCC 13950	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i> I/ <i>M. scrofulaceum</i> Ia	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>
302/08	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i> I	<i>M. kansasii</i> I	<i>M. kansasii</i>
8/07	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i> I	<i>M. kansasii</i> I	
27/07	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i> I	<i>M. kansasii</i> I	
128/07	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i> I	<i>M. kansasii</i> I	
245/07	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i> I	<i>M. kansasii</i> I	
60/08	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. fortuitum</i> IX	Não identificado	-
462/07	<i>M. peregrinum</i>	Peregrinum I	<i>M. peregrinum</i> I	
177/08	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. intracellulare</i> / <i>M. scrofulaceum</i> + Padrão Desconhecido	<i>M. porcinum</i> / <i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>
344/08	<i>M. szulgai</i>	<i>M. kansasii</i> IIa/ <i>M. szulgai</i>	<i>M. szulgai</i>	-
042/08	<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i>	Não identificado
102/08	<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i>	-
159/08	<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i>	-
197/08	<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i>	Não identificado
H37Rv	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	complexo <i>M. tuberculosis</i>	-

<sup>(a)</sup> - Não ocorreu amplificação <sup>(b)</sup> Campos a cinzento – isolados que não foram testados

## 2. Capacidade de diferenciação de MNT

### 2.1 PCR-RFLP de ITS

O método de identificação baseado no PCR-RFLP da região ITS permitiu a diferenciação precoce entre as micobactérias não tuberculosas de crescimento lento e de crescimento rápido, através da análise dos seus produtos de amplificação.

Contudo, não foi possível identificar 19 dos isolados, apenas com base nas combinações dos padrões de restrição obtidos com as diferentes enzimas utilizadas, nomeadamente os isolados pertencentes às espécies *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. szulgai* e *M. scrofulaceum*. Assim, será

necessário o uso de enzimas de restrição adicionais para a diferenciação e identificação específica dos isolados ao nível da espécie. A diferenciação entre *M. avium* e *M. boemicum* é possível através de um passo adicional de restrição dos produtos amplificados, com a enzima *DdeI*. Contudo, se a restrição com a enzima *DdeI*, sugerir *M. avium*, é necessário realizar uma segunda restrição adicional, neste caso com a enzima *AvaII*. Isto deve-se à elevada semelhança dos produtos de amplificação e restrição com as enzimas *HaeIII*, *CfoI* e *DdeI* entre *M. avium* e *M. kansasii* variante IV, como se pode visualizar no algoritmo elaborado por Roth *et al.* (2000). A inclusão destes passos adicionais permitiria averiguar se os isolados previamente identificados como *M. avium* pelo GenoType® Mycobacterium, pertencem realmente a esta espécie, comprovando também a identificação realizada pelo sistema comercial. A utilização da enzima de restrição *DdeI* também possibilitaria a diferenciação ao nível da espécie dos isolados que apresentaram como possível identificação as espécies *M. intracellulare*/*M. scrofulaceum*.

O isolado 177/08, identificado como *M. scrofulaceum* pelo GenoType® Mycobacterium, apresentou um padrão de restrição não descrito no algoritmo de Roth *et al.* (2000). Os produtos de amplificação obtidos (fragmentos de 215 e 290 pb), sugerem a presença de uma espécie de micobactéria de crescimento lento e outra de crescimento rápido, já que fragmentos inferiores a 240 pb correspondem a espécies de crescimento lento, com a excepção *M. nonchromogenicum*, *M. terrae* e *M. triviale* (Roth *et al.* 2000). No entanto, este padrão inclui os fragmentos correspondentes às espécies *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum*. Para testar se este isolado pertence a uma destas espécies ou se estamos na presença de um novo padrão, poder-se-ia também realizar a restrição dos seus produtos de amplificação com a enzima *DdeI*.

Outras espécies que requerem um passo adicional de restrição com esta enzima para a sua diferenciação são *M. kansasii* (variante IIa) e *M. szulgai* (Roth *et al.*, 2000).

Verifica-se assim que apesar da análise da região ITS possibilitar a identificação da maioria dos isolados de MNT, este método revela-se insuficiente para a identificação específica e correcta de todos os isolados estudados, caso não se recorra ao uso de enzimas de restrição adicionais como

*DdeI* e *Ava II*. No entanto, isto acarreta diversos inconvenientes, nomeadamente o tempo dispendido a realizar e analisar restrições adicionais e o aumento dos custos.

Uma outra dificuldade surge com a obtenção de padrões de restrição que não correspondem a nenhum dos descritos no algoritmo de Roth *et al.* (2000), não permitindo assim a identificação dos isolados. Dos seis isolados previamente identificados pelo GenoType® Mycobacterium como *M. fortuitum*, dois apresentaram padrões de restrição não descritos por Roth *et al.* (2000). Este facto sugere que *M. fortuitum* pode apresentar mais padrões de restrição para além dos descritos no algoritmo de Roth *et al.* (2000). Os novos padrões podem ser explicados pela maior variabilidade das sequências intragénicas nas espécies de micobactérias de crescimento rápido (Roth *et al.*, 2000), o que também pode ser comprovado pelo elevado número de padrões descritos por Roth *et al.* (2000) para esta espécie.

Um isolado (496/07) identificado através deste método como sendo *M. senegalense* foi identificado pelo GenoType® Mycobacterium como *M. fortuitum*. Este resultado pode se dever ao facto do sistema GenoType® Mycobacterium não identificar *M. senegalense*. Assim, a identificação obtida pelo sistema GenoType® Mycobacterium para este isolado, poderá eventualmente estar errada, o que não é inesperado, já que ambas as espécies apresentam uma grande semelhança no seu genoma, estando incluídas no mesmo complexo de espécies (complexo *M. fortuitum*). De facto, por sequenciação do 16S rDNA, *M. senegalense* diferencia-se de *M. fortuitum* terceira biovariante (estirpes ATCC 49403 e ATCC 49404) em apenas 4 e 5 pb, respectivamente e de *M. fortuitum* (ATCC 6841<sup>T</sup>) em 8 pb (Brown-Elliott & Wallace, 2002). A árvore filogenética elaborada por Tortoli (2006) com base na sequenciação do gene que codifica para o 16S rRNA também demonstra proximidade entre a espécie *M. fortuitum* e *M. senegalense* (Figura 11).

Esta semelhança entre *M. fortuitum* e *M. senegalense* é demonstrada no algoritmo de Roth *et al.* (2000), onde se verifica que para *M. fortuitum* (variante V) e *M. senegalense*, os produtos de amplificação e de restrição com a enzima *HaeIII* são iguais, apenas diferindo na restrição com *CfoI*.

Assim, não causa surpresa que o GenoType® Mycobacterium possa apresentar alguns limites na especificidade na sonda para *M. fortuitum*, ocorrendo reacções cruzadas com *M. senegalense*, tal como sugere Russo *et al.* (2006).

Um outro isolado, 60/08, também não apresentou identificação concordante com a identificação previamente realizada pelo GenoType® Mycobacterium, através do qual foi reconhecido como *M. peregrinum*, sendo aqui identificado como *M. fortuitum* (variante IX). Esta discrepância pode ser também explicada pelo grau de semelhança entre estas duas espécies, já que *M. peregrinum* pertence também ao complexo *M. fortuitum*. No entanto, neste caso, as duas espécies são identificáveis pelo sistema GenoType® Mycobacterium CM.



**Figura 11.** Árvore filogenética com base na análise do gene do 16S rRNA de micobactérias de crescimento rápido. (Adaptado de Tortoli, 2006).

## 2.2 Região ITS e regiões adjacentes

A maioria dos isolados testados não foi identificada por este método, devido essencialmente a dificuldades na etapa de amplificação. De facto, apesar das diversas tentativas para otimizar o



passo de PCR, não foi obtida qualquer amplificação para 10 dos 25 isolados testados com este método. Alguns destes 10 isolados correspondem a espécies que não foram testadas por Katoch *et al.* (2007), nomeadamente *M. abscessus*, *M. peregrinum*, *M. szulgai* e *M. xenopi*.

As diversas condições que foram alteradas na reacção de PCR de modo a tentar obter produtos de amplificação incluíram a concentração de MgCl<sub>2</sub>, dos “primers”, a temperatura de emparelhamento e a quantidade de DNA utilizada na reacção. Apesar das diversas modificações em cada um destes parâmetros, não foi possível obter produtos de amplificação. Este resultado sugere que os “primers” utilizados neste método podem apresentar alguma dificuldade em emparelhar com o DNA molde, devido variações na região onde pelo menos um dos “primers” emparelha, baixa estabilidade da ligação dos “primers” à sua zona-alvo, ou qualquer outro factor desconhecido que influencie o emparelhamento. Por outro lado, este método requer a amplificação de um fragmento relativamente grande (1800 pb), o que poderá condicionar o sucesso da etapa de polimerização da reacção de amplificação.

Verifica-se assim que o método proposto por Katoch *et al.* em 2007 não é fiável para a identificação de MNT, pois grande parte dos isolados testados não apresentou um fragmento de amplificação específico, enquanto outros apresentaram produtos de amplificação não documentados por Katoch *et al.* (2007). O facto do estudo inicialmente realizado por Katoch *et al.* (2007) incluir poucas espécies (apenas 11 espécies de MNT) pode levar a que novos padrões de restrição sejam encontrados para diferentes espécies ou mesmo para as espécies previamente identificadas. Por exemplo, os isolados identificados pelo GenoType® Mycobacterium CM como *M. gordonae*, apresentaram padrões que não permitiram a sua correspondência com os padrões descritos por Katoch *et al.* (2007). O facto do padrão se diferenciar dos já publicados, leva à consideração da existência de um novo padrão para *M. gordonae*. O mesmo facto ocorreu com os isolados previamente identificados pelo GenoType® Mycobacterium como *M. intracellulare*.

Para a espécie *M. xenopi* foi descrito no presente trabalho um padrão de restrição específico (Figura 7 e Tabela 12), que poderá permitir a identificação de futuros isolados desta espécie, já que *M. xenopi* não foi estudada por Katoch *et al.* (2007).

### 2.3 Gene *hsp65*

Quando se testou o método de PCR-RFLP do gene *hsp65*, apenas não foi obtida amplificação para um isolado, previamente identificado como *M. peregrinum* por GenoType® Mycobacterium. No entanto não se verificam problemas de amplificação com o segundo isolado identificado como *M. peregrinum* incluído neste estudo. Excluindo a hipótese de este DNA apresentar algum contaminante que iniba a reacção de PCR, já que o mesmo foi utilizado para os outros ensaios (com o GenoType® Mycobacterium e ITS-PCR), a explicação mais plausível para esta falha na amplificação será que o DNA deste isolado poderá apresentar uma mutação na região de ligação dos “primers”, impedindo deste modo, a amplificação da região pretendida.

Os padrões obtidos no PCR-RFLP de *hsp65* permitiram diferenciar isolados de MAC em *M. avium* e *M. intracellulare*, bem como *M. abscessus* e *M. chelonae* dentro do complexo *M. chelonae-abscessus* e, igualmente, diferenciar *M. peregrinum* dentro do complexo *M. fortuitum*, os quais, como já referido, englobam espécies semelhantes e muitas vezes não distinguíveis (Wong *et al.*, 2003; Bannalikal & Verma, 2006).

No nosso laboratório, *M. kansasii* foi identificado pelo PCR-RFLP de *hsp65* como sendo de *M. kansasii* variante I. Resultados semelhantes também foram relatados no resto da Europa (Alcaide *et al.*, 1997; Picardeau *et al.*, 1997; Taillard *et al.*, 2003), na América do Norte (Zhang *et al.*, 2004) e no Brasil (Chimara *et al.* 2004). *M. kansasii* variante I tem sido exclusivamente isolado a partir de seres humanos, enquanto a variante II tem sido isolada tanto em seres humanos como no ambiente e as outras variantes foram isoladas exclusivamente do ambiente (Tortoli, 2003).

Os quatro isolados para os quais não foi obtida uma identificação concordante entre o PCR-RFLP de *hsp65* e aquela previamente obtida pelo GenoType® Mycobacterium, foram identificados como *M. fortuitum*, *M. gordonae* e *M. intracellulare* pelo GenoType® Mycobacterium. Um isolado de *M. fortuitum* (GenoType® Mycobacterium) foi identificado por PCR-RFLP de *hsp65* como sendo *M. senegalense*. Tal como já discutido anteriormente no ponto 2.1 deste capítulo, esta discrepância deverá ter origem na semelhança entre as duas espécies e, uma vez que o GenoType® Mycobacterium não é capaz de identificar *M. senegalense* e esta identificação foi obtida por dois métodos independentes (PCR-RFLP ITS e PCR-RFLP *hsp65*), sugere-se que a identificação obtida pelo sistema GenoType® Mycobacterium para este isolado possa estar eventualmente errada e que se trate de facto de um isolado de *M. senegalense*.

Uma outra discrepância entre a identificação obtida por PCR-RFLP de *hsp65* e os métodos GenoType® Mycobacterium e PCR-RFLP de ITS foi verificada para dois isolados, identificados por PCR-RFLP de *hsp65* como *M. avium*, e por GenoType® Mycobacterium e PCR-RFLP de ITS como *M. intracellulare*. No entanto, estes dois isolados apresentam padrões de PCR-RFLP de ITS diferentes dos restantes isolados da mesma espécie. Verificou-se ainda que pelo método de PCR-RFLP de ITS e regiões adjacentes, não foi identificar estes dois isolados, pois os seus padrões de restrição eram diferentes dos descritos por Katoch *et al.* (2007) tanto para *M. intracellulare* como para *M. avium*.

Finalmente, o isolado identificado pelo GenoType® Mycobacterium como *M. gordonae* foi identificado por PCR-RFLP de *hsp65* como *M. malmoense*. Este isolado apresentou padrões de restrição que divergiram da identificação para *M. gordonae* (variante I) em apenas um fragmento de restrição de *BstEII*, em que foi obtido um fragmento de 100 pb em vez dos 80 pb descritos para *M. gordonae*. No entanto, o padrão de restrição com *HaeIII* aproxima-se mais de *M. gordonae* (variante I). Assim, fica a dúvida se trata de facto de um isolado de *M. malmoense* ou se existe alguma variabilidade nos padrões de PCR-RFLP *hsp65* ainda não documentada e que possa levar a uma sobreposição dos padrões obtidos para estas duas espécies.

Um dos isolados previamente identificados pelo GenoType® Mycobacterium como *M. fortuitum* (148/08), não foi identificado pelos vários algoritmos descritos para PCR-RFLP de *hsp65* (Telenti *et al.* (1993), Devallois *et al.* (1997) e Brunello *et al.* (2001)), sugerindo assim novo subtipo que não foi ainda descrito para esta espécie.

Devido ao erro associado à análise dos fragmentos de restrição, não é possível diferenciar a espécie (*M. porcinum*/*M. scrofulaceum*) a que correspondem os isolados 177/08 e 441/07, dada a elevada semelhança dos padrões de restrição destas duas espécies, dado que as diferenças entre os fragmentos variam entre 1 a 6 pb no caso do algoritmo de Brunello *et al.* (2001), que é o algoritmo que se aproxima mais dos resultados obtidos neste estudo. Neste caso, seria aconselhada a utilização de uma enzima de restrição adicional, de modo a diferenciar estas duas espécies, diminuindo a probabilidade de reportar uma identificação incorrecta.

Durante este estudo, verificou-se que a consulta da base de dados disponível na internet para interpretação dos padrões de PCR-RFLP de *hsp65* (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>), não constituiu uma vantagem na obtenção de resultados de identificação, verificando-se que a correspondência entre os tamanhos dos fragmentos obtidos (Tabela 13) e os apresentados na base de dados, levavam, na maioria dos casos, à identificação de várias espécies ou subespécies em simultâneo. Por esse motivo, optou-se por não utilizar esta base de dados para a identificação dos isolados testados.

A comparação dos resultados de identificação de MNT pelos vários métodos em análise revelou algumas discrepâncias em relação à identificação previamente obtida pelo GenoType® Mycobacterium CM/AS. De modo a esclarecer estas discrepâncias e a obter uma identificação conclusiva, deverá ser realizada a sequenciação do 16S rDNA para todos os isolados para os quais foram obtidos resultados de identificação não concordantes. Os resultados desta caracterização adicional permitirão esclarecer estas divergências e aferir a fiabilidade dos resultados gerados por cada um destes métodos.

### 3. Capacidade de diferenciação entre MNT e *M. tuberculosis*

Dos três métodos de identificação testados, os baseados no PCR-RFLP da região ITS e do gene *hsp65* permitiram ainda distinguir entre MNT e *M. tuberculosis*. Esta diferenciação é essencial para um laboratório que recebe e identifica *M. tuberculosis* na maioria das suas amostras, como é o caso do laboratório de Micobactérias do IHMT.

O facto de *M. tuberculosis* dar origem a padrões de PCR-RFLP (ITS/*hsp65*) diferentes dos obtidos para as MNT representa uma vantagem adicional, já que permite identificar possíveis misturas (amostras contendo *M. tuberculosis* e uma MNT). Estas situações, já descritas na literatura (Couto *et al.*, 2010) são de grande relevância para a selecção terapêutica.

Neste aspecto, o método de identificação baseado no PCR-RFLP da região ITS e regiões adjacentes apresenta novamente uma falha, já que não identificou a estirpe de referência de *M. tuberculosis* testada.

### 4. Problemas inerentes à análise dos resultados

Os três métodos de identificação de MNT testados envolvem a diferenciação por electroforese dos fragmentos resultantes da amplificação e sua restrição, através da determinação dos pesos moleculares dos mesmos.

Um problema sentido ao longo deste trabalho foi o das diferenças entre os tamanhos dos fragmentos de restrição obtidos e os publicados na literatura. Estas diferenças podem ser explicadas por variações nas metodologias utilizadas, que a nível experimental, tais como as condições de electroforese (voltagem e tempo), o tipo e concentração de agarose utilizada, quer a nível da interpretação dos resultados, nomeadamente, os programas informáticos utilizados para cálculo dos pesos moleculares e as margens de variação consideradas dentro de cada perfil (Kirschner *et al.*, 1993; Devallois *et al.*, 1997; da Silva Rocha *et al.*, 1999; Hafner *et al.*, 2004). Além disso, estes métodos exigem também algum treino para a interpretação das bandas obtidas nos géis, sendo para

isso também necessário obter resultados de electroforese que permitam uma fácil interpretação, tal como foi constatado num estudo multicêntrico para PCR-RFLP de *hsp65* (Leão *et al.*, 2005).

A utilização de géis de alta resolução e a implementação de métodos padronizados podem minimizar os erros inerentes à análise. No método de identificação por PCR-RFLP de *hsp65* é possível verificar que existem algumas variações nos padrões de restrição obtidos pelos diversos autores para determinadas espécies (Telenti *et al.*, 1993; Devallois *et al.*, 1997; Brunello *et al.*, 2001), o que podem ser explicado pela utilização de diferentes condições de análise. Brunello *et al.* (2001) demonstraram que os padrões de restrição obtidos, quando visualizados após electroforese em gel de poliacrilamida a 10% são determinados com maior precisão do que utilizando géis de agarose, apresentando uma diferença menor em relação aos seus tamanhos reais (determinados por sequenciação). No entanto, na prática, a utilização de géis de poliacrilamida revela-se mais trabalhosa e dispendiosa do que os géis de agarose (Devallois *et al.*, 1997; Brunello *et al.* 2001).

Outro problema que estes métodos acarretam está no facto de uma substituição, deleção ou adição de um único nucleotídeo, poder levar ao aparecimento ou desaparecimento de um local de restrição, conduzindo a um novo padrão de restrição, que poderá resultar numa identificação inconclusiva ou até mesmo errada. Um padrão de restrição novo é uma das possíveis causas de isolados não identificados ou de isolados que apresentam uma identificação não concordante com a anteriormente realizada com o GenoType® Mycobacterium CM/AS.

Um outro problema verificado neste trabalho foi a necessidade de se acrescentarem passos adicionais de análise, com recurso a outras enzimas de restrição, para aumentar o nível de discriminação entre algumas espécies. Estes passos adicionais, não efectuados neste trabalho, iriam aumentar os custos, tempo de resposta e carga laboral associados a estes métodos.

Finalmente, deparámo-nos com muitas dificuldades nos passos de restrição, nos vários métodos testados, verificando-se a inibição da restrição dos produtos amplificados após a etapa de purificação, sendo a sua causa desconhecida. Dado que a etapa de purificação não é referida nos diversos estudos de PCR-RFLP (Telenti *et al.*, 1993; Devallois *et al.*, 1997; Roth *et al.*, 2000;

Brunello *et al.*, 2001; da Silva Rocha *et al.*, 2002; Katoch *et al.*, 2007), optou-se por excluir esta etapa do procedimento experimental. Esta opção acabou por se revelar vantajosa, já que trabalhando directamente com os produtos de amplificação, foi possível obter restrições completas, tornando também todo o procedimento mais rápido e fácil de executar.

## V. CONCLUSÕES

Um dos principais métodos de identificação de MNT presentemente utilizado no laboratório de Micobactérias do IHMT é o GenoType® Mycobacterium. Este método fornece resultados de identificação no prazo de seis horas. As principais desvantagens deste método consistem no seu custo (cerca de 40 euros por teste) e a necessidade de se trabalhar a partir de cultura para se obter resultados fiáveis (Couto *et al.*, 2010). Em relação aos métodos testados nesta Dissertação, a partir do momento em que se obtenha cultura, eles fornecem resultados no prazo de um dia de trabalho para o PCR-RFLP de *hsp65* (e também para o PCR-RFLP do ITS e regiões adjacentes) e dois dias de trabalho para o PCR-RFLP da região ITS, já que este método requer o uso de restrições adicionais consoante os resultados obtidos nas restrições iniciais, sendo por isso considerado também o método mais trabalhoso. Assim, ao nível do tempo de resposta, o método de identificação mais rápido é o sistema GenoType® Mycobacterium. No entanto, o tempo de resposta do PCR-RFLP do gene *hsp65* não é muito maior que o do sistema GenoType® Mycobacterium, apresentado ainda custos mais reduzidos. Além disso, a obtenção de vários padrões de restrição para a mesma espécie permite a identificação de diferentes variantes, que poderá ser útil para futuros estudos epidemiológicos (Wayne & Sramek, 1992), tanto em termos de distribuição geográfica como de patogenicidade (Steingrube *et al.*, 1995), como foi demonstrado por estudos com *M. kansasii*, que demonstraram que apenas alguns subtipos estão associados com infecções humanas (Tortoli *et al.*, 1994; Alcaide *et al.*, 1997; Bloch *et al.*, 1998). Por outro lado, esta variabilidade pode constituir uma desvantagem para a implementação destes métodos na rotina, pois pode resultar numa elevada frequência de padrões ambíguos ou não interpretáveis.

Os métodos de identificação molecular baseados no PCR-RFLP da região ITS e do gene *hsp65* provaram ser relativamente rápidos e com potencial para identificar MNT. Contudo, estes dois métodos apresentam problemas, que na sua maioria, se relacionam com a interpretação dos



padrões de restrição obtidos, dada a variabilidade inerente à separação de fragmentos de diferentes tamanhos em electroforese em gel de agarose, levando a divergências entre os padrões obtidos e os descritos na literatura, dificultando assim a identificação de alguns isolados. Para estes métodos ainda não foram estabelecidos protocolos padronizados, principalmente na etapa de electroforese, fundamental para que a análise dos resultados obtidos apresente o mínimo de discrepâncias quando comparados com os publicados, possibilitando deste modo uma interpretação mais fácil e menos dúbia (da Silva *et al.*, 2001; Häfner *et al.*, 2004). De forma a atenuar estas limitações, seria vantajoso para o laboratório adoptar os seus próprios algoritmos para as espécies mais frequentemente isoladas. Por outro lado, não foi possível obter uma identificação final para alguns dos isolados, ou porque foram obtidos novos padrões de restrição ou porque são necessárias restrições adicionais. Assim, a crescente quantidade de dados disponíveis e identificação de novos padrões acaba por tornar a análise mais complexa, tal como foi constatado na tentativa de interpretação dos resultados de restrição através da base de dados disponível “online”.

Um potencial inconveniente dos métodos PCR-RFLP de *hsp65* e da região ITS é a inespecificidade dos “primers” utilizados para a amplificação para o género *Micobacterium*. Estudos anteriores referem a obtenção de produtos de amplificação pelo método PCR-RFLP de *hsp65* a partir de DNA de *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, *Nocardia braziliensis*, *Streptomyces albus* e *Rhodococcus equi* (Taylor *et al.*, 1997; de Magalhães *et al.*, 2002). Contudo, os padrões obtidos após restrição desses produtos de amplificação, não coincidem com nenhum dos padrões de identificação obtidos para micobactérias, o que permite ainda a sua utilização como método de identificação (de Magalhães *et al.*, 2002). Em relação ao método de PCR-RFLP da região ITS, a especificidade dos “primers” utilizados foi previamente analisada por Roth *et al.* (2000) Num conjunto de 811 estirpes, correspondendo a 122 espécies, de 37 géneros e com a excepção de *Gordonia terrae*, nenhuma outra bactéria para além das micobactérias, foi amplificada com este par de “primers”, o que lhe confere vantagem em relação ao método PCR-RFLP de *hsp65*.

Por último, verificaram-se ainda algumas dificuldades em obter produto de amplificação, que foram muito mais óbvias no método de PCR-RFLP do ITS e regiões adjacentes, mas que também se verificaram com o método de PCR-RFLP do *hsp65*, para um isolado apenas.

A inclusão de maior número de isolados nos testes deverá facilitar a adaptação dos métodos à sua implementação na rotina dos laboratórios e ao mesmo tempo, avaliar a variabilidade intra-específica dos padrões obtidos. A sua apreciação (avaliação) deverá abranger o maior número de espécies geralmente identificadas nos respectivos laboratórios, obtendo-se assim um maior nível de representatividade. Será igualmente importante testar para todas as espécies, a respectiva estirpe de referência, construindo-se deste modo o algoritmo da forma mais correcta.

Alguns autores defendem a implementação do método PCR-RFLP do gene *hsp65*, utilizado em conjunto com algumas características fenotípicas, tais como a taxa de crescimento e produção de pigmento, para identificação de micobactérias (Leão *et al.*, 2005). Esta abordagem poderia ser uma alternativa ao sistema GenoType® Mycobacterium. Contudo, este sistema apresenta uma elevada precisão e sensibilidade, tal como indicam alguns estudos (Mäkinen *et al.*, 2002; Russo *et al.*, 2006) e a interpretação dos resultados é mais simples do que através dos métodos PCR-RFLP, apresentando assim uma melhor relação custo-eficiência, e maior confiança nas identificações obtidas.

Conclui-se assim que apesar das várias vantagens referidas na literatura para os três métodos de identificação “in-house” testados nesta Dissertação, o grau de variabilidade e dificuldade de interpretação associados aos padrões obtidos, limitam a sua implementação no laboratório de diagnóstico de micobacteriologia.

## VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADÉKAMBI, T. & DRANCOURT, M., 2004. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**: 2095–2105.

ADÉKAMBI, T., COLSON, P. & DRANCOURT, M., 2003. *rpoB*-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, **41** (12): 5699–5708.

ALCAIDE, F., RICHTER, I., BERNASCONI, C., SPRINGER, B., HAGENAU, C., SCHULZE-RÖBBECKE, R., TORTOLI, E., MARTÍN, R., BÖTTGER, E. & TELENTI, A., 1997. Heterogeneity and clonality among isolates of *Mycobacterium kansasii*: implications for epidemiological and pathogenicity studies. *Journal of Clinical Microbiology*, **35** (8): 1959-1964.

AL-MAHRUQI, S. H., VAN-INGEN, J., AL-BUSAIDY, S., BOEREE, M. J., AL-ZADJALI, S., PATEL, A., DEKHUIJZEN, R. P. N. & SOOLINGEN, D. V., 2009. Clinical relevance of nontuberculous Mycobacteria, Oman. *Emerging Infectious Diseases*, **15** (2): 292-294.

BANNALIKAR, A. S. & VERMA, R., 2006. Detection of *Mycobacterium avium* & *M. tuberculosis* from human sputum cultures by PCR-RFLP analysis of *hsp65* gene & *pncA* PCR. *The Indian Journal of Medical Research*, **123** (2): 165-172.

BARRETO, M. M., CHACÓN, C. A. V., RIVERO, C. B., BLANCO, P. A., JOST, K. C., BALANDRANO, S. & DÍAZ, H. O., 2000. Comparison among three methods for mycobacteria identification. *Salud Pública de México*, **42** (6): 484-489.

BLACKWOOD, K. S., HE, C., GUNTON, J., TURENNE, C., WOLFE, J. & KABANI, A. M., 2000. Evaluation of *recA* sequences for identification of *Mycobacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, **38** (8): 2846-2852.

- BLOCH, K. C., ZWERLING, L., PLETCHER, M. J., HAHN, J. A., GERBERDING, J. L., OSTROFF, S. M., VUGIA, D. J. & REINGOLD, A. L., 1998. Incidence and clinical implications of isolation of *Mycobacterium kansasii*: results of a 5-year, population-based study. *Annals of Internal Medicine*, **129** (9): 698-704.
- BROWN-ELLIOTT, B. A. & WALLACE, R. J., 2002. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, **15** (4): 716-746.
- BRUNELLO, F., LIGOZZI, M., CRISTELLI, E., BONORA, S., TORTOLI, E. & FONTANA, R., 2001. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *hsp65* gene. *Journal of Clinical Microbiology*, **39** (8): 2799-2806.
- CARSON, L. A., PETERSEN, N. J., FAVERO, M. S. & AGUERO, S. M., 1978. Growth characteristics of atypical *Mycobacteria* in water and their comparative resistance to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*, **36** (6): 839-846.
- CHIMARA, E., GIAMPAGLIA, C. M., MARTINS, M. C., TELLES, M. A., UEKI, S. Y. & FERRAZOLI, L., 2004. Molecular characterization of *Mycobacterium kansasii* isolates in the State of São Paulo between 1995-1998. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **99** (7): 739-743.
- COUTO, I., MACHADO, D., VIVEIROS, M., RODRIGUES, L., AMARAL, L., 2010. Identification of nontuberculous mycobacteria in clinical samples using molecular methods: a three-year study. *Clinical Microbiology and Infection*, *In press*.
- COUTO, I., PEREIRA, S., MIRAGAIA, M., SANCHES, I. S., & DE LENCASTRE, H., 2001. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **39** (9): 3099-3103.
- CRUZ, A. T., GOYTIA, V. K., STARKE, J. R., 2007. *Mycobacterium simiae* complex infection in an immunocompetent child. *Journal of Clinical Microbiology*, **45** (8): 2745-2746.

- DA SILVA ROCHA, A., DA COSTA LEITE, C., TORRES, H. M., DE MIRANDA, A. B., PIRES LOPES, M. Q., DEGRAVE, W. M. & SUFFYS, P. N., 1999. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil. *Journal of Microbiological Methods*, **37** (3), 223-229.
- DANTEC, C. L., DUGUET, J.-P., MONTIEL, A., DUMOUTIER, N., DUBROU, S. & VINCENT, V., 2002. Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology*, **68** (3): 1025-1032.
- DE MAGALHÃES, V. D., DE MELO AZEVEDO, F. D., PASTERNAK, J., & MARTINO, M. D. V., 2002. Reliability of *hsp65*-RFLP analysis for identification of *Mycobacterium* species in cultured strains and clinical specimens. *Journal of Microbiological Methods*, **49** (3): 295-300.
- DEEPA, P., THERESE, K. L. & MADHAVAN, H.N., 2005. Application of PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) for the identification of mycobacterial isolates. *Indian Journal of Medical Research*, **121**: 694-700.
- DEVALLOIS, A., GOH, K.S. & RASTOGI N., 1997. Rapid Identification of mycobacteria to species level by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *Journal of Clinical Microbiology*, **35** (11): 2969-2973.
- DONLAN, R. M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, **8** (9): 881-890.
- DVORSKÁ, L., BARTOŠ, M., MARTIN, G., ERLER, W. & PAVLÍK, I., 2001. Strategies for differentiation, identification and typing of medically important species of mycobacteria by molecular methods. *Veterinary Medicine*, **46** (11-12): 309-328.
- EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Mycobacterium*. In <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>

- FALKINHAM, J. O., 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, **9** (2): 177-215.
- FALKINHAM, J. O., 2003. The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. *The Canadian Journal of Infectious Diseases*, **14** (5): 281-286.
- GANGADHARAM, P. R. J., 1980. Atypical mycobacteriosis. *Indian Journal of Tuberculosis*, **XXVII** (3): 108-114.
- GIAMPAGLIA, C. M. S., MARTINS, M. C., CHIMARA, E., OLIVEIRA, R. S., VIEIRA, G. B. DE O., MARSICO, A. G., MELLO, F. C. Q., FONSECA, L. DE S., KRITSKI, A. & TELLES, M. A. DA S., 2007. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* from other mycobacteria with p-nitrobenzoic acid using MGIT960. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, **11** (7): 803-807.
- GINGERAS, T. R., GHANDOUR, G., WANG, E., BERNO, A., SMALL, P. M., DROBNIEWSKI, F., ALLAND, D., DESMOND, E., HOLODNIY, M. & DRENKOW, J., 1998. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays. *Genome Research*, **8** (5): 435-448.
- GITTI, Z., NEONAKIS, I., FANTI, G., KONTOS, F., MARAKI, S. & TSELENTIS, Y., 2006. Use of the GenoType® *Mycobacterium* CM and AS assays to analyze 76 nontuberculous mycobacterial isolates from Greece. *Journal of Clinical Microbiology*, **44** (6): 2244-2246.
- GRIFFITH, D. E., AKSAMIT, T., BROWN-ELLIOTT, B. A., CATANZARO, A., DALEY, C., GORDIN, F., HOLLAND, S. M., HORSBURGH, R., HUITT, G., IADEMARCO, M. F., ISEMAN, M., OLIVIER, K., RUOSS, S., FORDHAM VON REYN, C., WALLACE, JR. R. J. & WINTHROP, K., 2007. Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American Thoracic Society (ATS) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA)*, **175**: 367-416.

- HÄFNER, B., HAAG, H., GEISS, H., & NOLTE, O., 2004. Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new *hsp65* restriction fragment length polymorphism patterns. *Molecular and Cellular Probes*, **18** (1): 59-65.
- HARTMANS, S., BONT, J. A. M. DE & STACKEBRANDT, E., 2006. Chapter 1.1.19. The genus *Mycobacterium* - Nonmedical, p. 889–918, *In The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria, Vol.3*
- HASHIMOTO, A., KOGA, H., KOHNO, S., MIYAZAKI, Y., KAKU, M. & HARA, K., 1996. Rapid detection and identification of mycobacteria by combined method of polymerase chain reaction and hybridization protection assay. *The Journal of Infection*, **33** (2): 71-77.
- HERNANDEZ, S. M., MORLOCK, G. P., BUTLER, W. R., CRAWFORD, J. T., & COOKSEY, R. C., 1999. Identification of *Mycobacterium* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses using fluorescence capillary electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, **37** (11): 3688-3692.
- HUSSEIN, Z., LANDT, O., WIRTHS, B. & WELLINGHAUSEN, N., 2009. Detection of non-tuberculous mycobacteria in hospital water by culture and molecular methods. *International Journal of Medical Microbiology*, **299** (4): 281-90.
- INDERLIED, C. B., KEMPER, C. A. & BERMUDEZ, L. E., 1993. The *Mycobacterium avium* complex. *Clinical Microbiology Reviews*, **6** (3): 266-310.
- IWEN, P. C., TARANTOLO, S. R., MOHAMED, A. M. & HINRICHS, S. H., 2006. First report of *Mycobacterium nebraskense* as a cause of human infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **56**: 451-453.
- JARZEMBOWSKI, J. A. & YOUNG, M. B., 2008. Nontuberculous mycobacterial Infections. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, **132** (8): 1333-1341.

- JOHANSEN, I. S., 2006. Rapid diagnoses of mycobacterial diseases, and their implication on clinical management. *Danish Medical Bulletin*, **53** (1): 28-45.
- JORDAN, P. W., STANLEY, T., DONNELLY, F. M., ELBORN, J. S., MCCLURG, R. B., MILLAR, B. C., GOLDSMITH, C. E. & MOORE, J. E. , 2007. Atypical mycobacterial infection in patients with cystic fibrosis: update on clinical microbiology methods. *Letters in Applied Microbiology*, **44** (5): 459-466.
- KAHANA, L. M., RICHARDSON, H. & COLE, F. M., 1975. Clinical aspects of atypical mycobacterial infection. *CMA Journal*, **112**: 321-324.
- KATOCH, V. M., 2004. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *The Indian Journal of Medical Research*, **120** (4): 290-304.
- KATOCH, V.M., PARASHAR, D., CHAUHAN, D.S., SINGH, D., SHARMA, V.D. & GHOSH, S., 2007. Rapid identification of mycobacteria by gene amplification restriction analysis technique targeting 16S-23S ribosomal RNA internal transcribed spacer & flanking region. *Indian Journal of Medical Research*, **125** (2): 155-162.
- KELLOGG, J. A. BANKERT, D. A., WITHERS, G. S., SWEIMLER, W., KIEHN, T. E. & PFYFFER, G. E., 2001. Application of the Sherlock mycobacteria identification system using high performance liquid chromatography in a clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, **39** (3): 964-970.
- KIM, B. J., LEE, K. H., PARK, B. N., KIM, S. J., BAI, G. H. & KOOK, Y. H., 2001. Differentiation of mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *Journal of Clinical Microbiology*, **39** (6): 2102-2109.
- KIM, B., LEE, S., LYU, M., KIM, S., BAI, G., KIM, S., CHAE, G., KIM, E., CHA, C. & KOOK, Y., 1999. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *Journal of Clinical Microbiology*, **37** (6): 1714-1720.



KIM, H. J., MUN, H. S., KIM, H., OH, E. J., HÁ, Y., BAI, G. H., PARK, Y.G., CHA, C. Y., KOOK, Y.H. & KIM, B. J., 2006. Differentiation of mycobacterial species by *hsp65* duplex PCR followed by duplex-PCR-based restriction analysis and direct sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, **44** (11): 3855-3862.

KIM, H., KOOK, Y., YUN, Y., PARK, C. G., LEE, N. Y., SHIM, T. S., KIM, B. & KOOK, Y., 2008. Proportions of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* strains among Korean *Mycobacterium chelonae-Mycobacterium abscessus* group isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, **46** (10): 3384-3390.

KIRSCHNER, P., SPRINGER, B., VOGEL, U., MEIER, A., WREDE, A., KIEKENBECK, M., BANGE, F. C. & BÖTTGER, E. C., 1993. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, **31** (11): 2882-2889.

KUYPER, D., ALI, H.H., MOHAMED, A.M. & HINRICHS, S.H., 2004. Identification of *Mycobacterium* species using curated custom databases. *18th International Parallel and Distributed Processing Symposium, 2004. Proceedings*: 191-197.

LEÃO, S. C., BRIONES, M. R., SIRCILI, M. P., BALIAN, S. C., MORES, N. & FERREIRA-NETO, J. S., 1999. Identification of two novel *Mycobacterium avium* allelic variants in pig and human isolates from Brazil by PCR-restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, **37** (8): 2592-2597.

LEÃO, S. C., MARTIN, A., MEJIA, G. I., PALOMINO, J. C., ROBLEDO, J., TELLES, M. A. DA S. & PORTAELS F., 2005. *Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria*.

LEBRUN, L., WEILL, F., LAFENDI, L., HOURIEZ, F., CASANOVA, F., GUTIERREZ, M. C., INGRAND, D., LAGRANGE, P., VINCENT, V. & HERRMANN, J. L., 2005. Use of the INNO-

LiPA-MYCOBACTERIA assay (version 2) for identification of *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium scrofulaceum* complex isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, **43** (6): 2567-2574.

LEE, C. K., GI, H. M., CHO, Y., KIM, Y. K., LEE, K. N., SONG, K., SONG, J., PARK, K. S., PARK, E. M., LEE, H. & BAI, G., 2004. The genomic heterogeneity among *Mycobacterium terrae* complex displayed by sequencing of 16S rRNA and *hsp65* genes. *Microbiology and Immunology*, **48** (2): 83-90.

LEE, H., BANG, H., BAI, G. & CHO, S., 2003. Novel polymorphic region of the *rpoB* gene containing *Mycobacterium* species-specific sequences and its use in identification of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, **41** (5): 2213-2218.

LEITE, C. Q. F., ROCHA, A. DA S., LEITE, S. R. DE A., FERREIRA, R. M. C., SUFFYS, P. N., FONSECA, L. DE S. & SAAD, M. H. F., 2005. A comparison of mycolic acid analysis for nontuberculous mycobacteria identification by thin-layer chromatography and molecular. *Microbiology and Immunology*, **49** (7): 571-578.

LUNA, F. F. A. DE, RUIZ, P., GUTIÉRREZ, J. & CASAL, M., 2006. Evaluation of the GenoType Mycobacteria direct assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and four atypical Mycobacterial species in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, **44** (8): 3025-3027.

MÄKINEN, J., SARKOLA, A., MARJAMÄKI, M., VILJANEN, M. K. & SOINI, H., 2002. Evaluation of GenoType and LiPA MYCOBACTERIA assays for identification of Finnish mycobacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, **40** (9): 3478-3481.

MARINHO, A., FERNANDES, G., CARVALHO, T., PINHEIRO, D. & GOMES, I., 2008. Micobactérias atípicas em doentes sem síndrome de imunodeficiência adquirida. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, **14** (3): 323-337.

MCNABB, A., EISLER, D., ADIE, K., AMOS, M., RODRIGUES, M., STEPHENS, G., BLACK, W. A. & ISAAC-RENTON, J., 2004. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *Journal of Clinical Microbiology*, **42** (7): 3000-3011.

MIJS, W., DE VREESE, K., DEVOS, A., POTTEL, H., VALGAEREN, A., EVANS, C., NORTON, J., PARKER, D., RIGOUTS, L., PORTAELS, F., REISCHL, U., WATTERSON, S., PFYFFER, G. & ROSSAU, R., 2002. Evaluation of a commercial line probe assay for identification of *Mycobacterium* species from liquid and solid culture. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **21** (11): 794-802.

MILLER, N., INFANTE, S. & CLEARY, T., 2000. Evaluation of the LiPA MYCOBACTERIA assay for identification of mycobacterial species from BACTEC 12B bottles. *Journal of Clinical Microbiology*, **38** (5): 1915-1919.

MOHAMED, A.M., KUYPER, D. J., IWEN, P. C., ALI, H. H., BASTOLA, D. R. & HINRICHS, S. H., 2005. Computational approach involving use of the internal transcribed spacer 1 region for identification of *Mycobacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, **43** (8): 3811-3817.

MURCIA, M. I., TORTOLI, E., MENENDEZ, M. C., PALENQUE, E. & GARCIA, M. J., 2006. *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**:2049-2054.

NEONAKIS, I. K., GITTI, Z., KRAMBOVITIS, E. & SPANDIDOS, D. A., 2008. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *Journal of Microbiological Methods*, **75**: 1-11.

NINET, B., MONOD, M., EMLER, S., PAWLOWSKI, J., METRAL, C., ROHNER, P., AUCKENTHALER, R. & HIRSCHL, B., 1996. Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain. *Journal of Clinical Microbiology*, **34** (10): 2531-2536.

- PADILLA, E., GONZÁLEZ, V., MANTEROLA, J. M., PÉREZ, A., QUESADA, M. D., GORDILLO, S., VILAPLANA, C., PALLARÉS, M. A., MOLINOS, S., SÁNCHEZ, M. D. & AUSINA, V., 2004. Comparative evaluation of the new version of the INNO-LiPA Mycobacteria and genotype Mycobacterium assays for identification of *Mycobacterium* species from MB/BacT liquid cultures artificially inoculated with mycobacterial strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **42** (7): 3083-3088.
- PICARDEAU, M., PROD'HOM, G., RASKINE, L., LEPENNEC, M. P., & VINCENT, V., 1997. Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *Journal of Clinical Microbiology*, **35** (1): 25-32.
- PIERSIMONI, C. & SCARPARO, C., 2008. Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *The Lancet Infectious Diseases*, **8** (5): 323-334.
- POURAHMAD, F., THOMPSON, K. D., ADAMS, A. & RICHARDS, R. H., 2009. Comparative evaluation of Polymerase Chain Reaction-Restriction Enzyme Analysis (PRA) and sequencing of heat shock protein 65 (*hsp65*) gene for identification of aquatic mycobacteria. *Journal of Microbiological Methods*, **76** (2): 128-135.
- PRATHER, E. C., BOND, J. O., HARTWIG, E. C. & DUNBAR, F. P., 1961. Preliminary Report: Epidemiology of infections due to the atypical acid-fast bacilli. *CHEST*, **39** (2):129-139.
- PRIMM, T.P., LUCERO, T.P. & FALKINHAM, J. O., 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, **17** (1): 98-106.
- REISCHL, U., FELDMANN, K., NAUMANN, L., GAUGLER, B. J. M., NINET, B., HIRSCHL, B. & EMLER, S., 1998. 16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, **46** (6): 1761-1764.

RICHARD, J. W., GLASSROTH, J., GRIFFITH, D. E., OLIVIER, K. N., COOK, J. L. & GORDIN, F., 1997. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. American Thoracic Society. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **156**: S1-S25.

RINGUET, H., AKOUA-KOFFI, C., HONORE, S., VARNEROT, A., VINCENT, V., BERCHE P., GAILLARD, J. L. & PIERRE-AUDIGIER, C., 1999. *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, **37** (3): 852-857.

RODRIGUES, L., WAGNER, D., VIVEIROS, M., SAMPAIO, D., COUTO, I., VAVRA, M., KERN, W. V. & AMARAL, L., 2008. Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **61** (5): 1076-1082.

ROTH, A., REISCHL, U., STREUBEL, A., NAUMANN, L., KROPPESTEDT, R. M., HABICHT, M., FISCHER, M. & MAUCH, H., 2000. Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. *Journal of Clinical Microbiology*, **38** (3): 1094-1104.

RUSSO, C., TORTOLI, E. & MENICHELLA, D., 2006. Evaluation of the new GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species. *Journal of Clinical Microbiology*, **44** (2): 334-339.

SAIMAN, L., 2004. The mycobacteriology of non-tuberculous mycobacteria. *Paediatric Respiratory Reviews*, **5** (Suppl A): 221-223.

SAVIOLA, B. & BISHAI, W., 2006. Chapter 1.1.18. The genus *Mycobacterium*-Medical, p. 919–933, *In The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, Vol.3.

SCHINSKY, M. F., MOREY, R. E., STEIGERWALT, A. G., DOUGLAS, M. P., WILSON, R.W., FLOYD, M. M., BUTLER, W. R., DANESHVAR, M. I., BROWN-ELLIOTT, B. A., WALLACE,

- R. J., MCNEIL, M. M., BRENNER, D. J. & BROWN, J. M., 2004. Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenickei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov., *Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and *Mycobacterium brisbanense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54** (Pt 5): 1653-1667.
- SHRESTHA, N. K., TUOHY, M. J., HALL, G. S., REISCHL, U., GORDON, S. M. & PROCOP, G. W., 2003. Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **41** (11): 5121-5126.
- DA SILVA, C. F., UEKI, S. Y., GEIGER, D. D., & LEÃO, S. C., 2001. *hsp65* PCR-restriction enzyme analysis (PRA) for identification of mycobacteria in the clinical laboratory. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **43** (1): 25-28.
- SIVASANKARI, P., KHYRIEM, A. B., VENKATESH, K. & PARIJA, S. C., 2006. Atypical mycobacterial infection among HIV seronegative patients in pondicherry. *The Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences*, **48**: 107-109.
- SOLAR, M. DEL, SALOMÓN, M., BRAVO, F., SEAS, C., GOTUZZO, E., CULQUI, D., MUNAYCO C., BOLARTE, J. & SUÁREZ, L., 2005. Rapidly growing mycobacteria-related skin infection after cosmetic mesotherapy. *Folia Dermatológica*, **16** (3): 127-135.
- STAUFFER, F., HABER, H., RIEGER, A., MUTSCHLECHNER, R., HASENBERGER, P., TEVERE, V. J. & K.N YOUNG, K. Y., 1998. Genus level identification of mycobacteria from clinical specimens by using an easy-to-handle *Mycobacterium*-specific PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **36** (3): 614–617.
- STEINGRUBE, V. A., GIBSON, J. L., BROWN, B. A., ZHANG, Y., WILSON, R. W., RAJAGOPALAN, M. & WALLACE, R. J., 1995. PCR amplification and restriction endonuclease

analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, **33** (1):149-53.

SUFFYS, P. N., DA SILVA ROCHA, A., DE OLIVEIRA, M., CAMPOS, C. E., BARRETO, A. M., PORTAELS, F., RIGOUTS, L., WOUTERS, G, JANNES, G, VAN REYBROECK, G, MIJS, W. & VANDERBORGHT, B., 2001. Rapid identification of Mycobacteria to the species level using INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **39** (12): 4477-4482.

TAILLARD, C., GREUB, G., WEBER, R., PFYFFER, G. E., BODMER, T., ZIMMERLI, S., FREI, R., BASSETTI, S., ROHNER, P., PIFFARETTI, J., BERNASCONI, E., BILLE, J., TELENTI, A. & PROD'HOM, G., 2003. Clinical implications of *Mycobacterium kansasii* species heterogeneity: Swiss National Survey. *Journal of Clinical Microbiology*, **41** (3): 1240-1244.

TELENTI, A., MARCHESI, F., BALZ, M., BALLY, F., BOTTGER, E. C. & BODMER, T., 1993. Rapid identification of Mycobacteria to the species level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, **31** (2): 175-178.

THAVAGNANAM, S., MCLOUGHLIN, L. M., HILL, C. & JACKSON, P. T., 2006. Atypical mycobacterial infections in children: The case for early diagnosis. *The Ulster Medical Journal*, **75** (3): 192-194.

TORTOLI, E., 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clinical Microbiology Reviews*, **16** (2): 319-54.

TORTOLI, E., 2004. Clinical features of infections caused by new nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiology Newsletter*, **26** (12): 89-96.

TORTOLI, E., 2006. The new mycobacteria: an update. *FEMS immunology and medical microbiology*, **48** (2), 159-178.

- TORTOLI, E., SIMONETTI, M. T., LACCHINI, C., PENATI, V. & URBANO, P., 1994. Tentative evidence of AIDS-associated biotype of *Mycobacterium kansasii*. *Journal of Clinical Microbiology*, **32** (7): 1779-1782.
- TURENNE, C. Y., COLLINS, D. M., ALEXANDER, D. C. & BEHR, M. A., 2008. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *avium* are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. *Journal of Bacteriology*, **190** (7): 2479-2487.
- TURENNE, C. Y., SEMRET, M., COUSINS, D. V., COLLINS, D. M. & BEHR, M. A., 2006. Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, **44** (2): 433-40.
- TURENNE, C. Y., TSCHETTER, L., WOLFE, J., & KABANI, A., 2001. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *Journal of Clinical Microbiology*, **39** (10): 3637-3648.
- TURENNE, C. Y., WALLACE, R. & BEHR, M. A., 2007. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clinical Microbiology Reviews*, **20** (2): 205-229.
- VIANA-NIERO, C., LIMA, K. V. B., LOPES, MARIA L., RABELLO, M. C. S., MARSOLA, L. R., BRILHANTE, V. C. R., DURHAM, A. M. & LEÃO, S. C., 2008. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. *Journal of Clinical Microbiology*, **46** (3): 850-855.
- VIJAYARAGHAVAN, R., CHANDRASHEKHAR, R., SUJATHA, Y. & BELAGAVI, C. S., 2006. Hospital outbreak of atypical mycobacterial infection of port sites after laparoscopic surgery. *The Journal of Hospital Infection*, **64** (4): 344-347.



WALLACE, R. J., BROWN-ELLIOTT, B. A., WILSON, R. W., MANN, L., HALL, L., ZHANG, Y., JOST, K.C., BROWN, J.M., KABANI, A., SCHINSKY, M. F., STEIGERWALT, A. G., CRIST, C. J., ROBERTS, G. D., BLACKLOCK, Z., TSUKAMURA, M., SILCOX, V. & TURENNE, C., 2004. Clinical and laboratory features of *Mycobacterium porcinum*. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**(12), 5689-5697.

WAYNE, L. G. & SRAMEK, H. A., 1992. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, **5** (1): 1-25.

WILSON, R. W., STEINGRUBE, V. A., BÖTTGER, E. C., SPRINGER, B., BROWN-ELLIOTT, B. A., VINCENT, V., JOST, K. C., ZHANG, Y., GARCIA, M. J., CHIU, S. H., ONYI, G. O., ROSSMOORE, H., NASH, D. R. & WALLACE, R. J., 2001. *Mycobacterium immunogenum* sp. nov., a novel species related to *Mycobacterium abscessus* and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**: 1751-64.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009. Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report.

WU, T., LU, C. & LAI, H., 2009. Current Situations on Identification of Nontuberculous Mycobacteria. *Journal of Biomedical Laboratory Sciences*, **21** (1): 1-6.

YAM, W. C., YUEN, K. Y., KAM, S.Y., YIU, L. S., CHAN, K. S., LEUNG, C. C., TAM, C. M., HO, P.O., YEW, W. W., SETO, W. H. & HO, P. L., 2006. Diagnostic application of genotypic identification of mycobacteria. *Journal of Medical Microbiology*, **55**: 529-536.

ZHANG, Y., MANN, L. B., WILSON, R. W., BROWN-ELLIOTT, B. A., VINCENT, V., IINUMA, Y. & WALLACE, R. J., 2004. Molecular analysis of *Mycobacterium kansasii* isolates from the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, **42** (1): 119-25.